

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP00/04862

日 本 国 特 許 庁

19.07.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 12 SEP 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 3月24日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-085377

出 願 人

Applicant (s):

科学技術振興事業団

JP00/04862

EW

PRIORITY

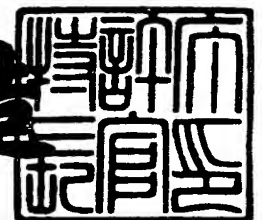
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3066644

【書類名】 特許願

【整理番号】 11-337

【提出日】 平成12年 3月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都八王子市南陽台2-18-12

【氏名】 山田 晃世

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東久留米市大門町2-3-6-302

【氏名】 小関 良宏

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区和田2-21-39

【氏名】 齋藤 丈夫

【特許出願人】

【識別番号】 599117842

【氏名又は名称】 山田 晃世

【特許出願人】

【識別番号】 599101760

【氏名又は名称】 小関 良宏

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第235910号

【出願日】 平成11年 7月19日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 環境ストレス耐性遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項2】 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項3】 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 宿主細胞が、大腸菌であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項5】 大腸菌が、SOLR株であることを特徴とする請求項4記載のスクリーニング方法。

【請求項6】 宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下が、350mM以上の塩濃度の条件下であることを特徴とする請求項5記載のスクリーニング方法。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項7記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコー

ドするDNA。

【請求項9】 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項8記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項10】 環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質が、植物由来のタンパク質であることを特徴とする請求項7～9のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項11】 植物が、マングローブ (*Rhizophora mangle*) であることを特徴とする請求項10記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項12】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項13】 配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項14】 請求項13記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項15】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c) 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が

欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項16】 配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項17】 請求項16記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項18】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項19】 配列番号5に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項20】 請求項19記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項21】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項22】 配列番号7に示される塩基配列若しくはその相補的配列又

はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項 2 3】 請求項 2 2 記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 2 4】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列と相同性が 7 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項 2 5】 配列番号 9 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項 2 6】 請求項 2 5 記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 2 7】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列と相同性が 7 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項 2 8】 配列番号 1 1 に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項 2 9】 請求項 2 8 記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有

するタンパク質をコードするDNA。

【請求項30】 以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号14に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

(c)配列番号14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質

【請求項31】 配列番号13に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA。

【請求項32】 請求項31記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項33】 請求項7～32のいずれか記載のDNAを用いることを特徴とする環境ストレス耐性の向上方法。

【請求項34】 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項33記載の環境ストレス耐性の向上方法。

【請求項35】 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項34記載の環境ストレス耐性の向上方法。

【請求項36】 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項37】 配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項38】 配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項39】 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項40】 配列番号4に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項41】 配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項42】 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項43】 配列番号6に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項44】 配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項45】 配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項46】 配列番号8に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項47】 配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項48】 配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

。 【請求項49】 配列番号10に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項50】 配列番号10に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項51】 配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項52】 配列番号12に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項53】 配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項54】 配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項55】 配列番号14に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項56】 配列番号14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質。

【請求項57】 請求項36～38のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項58】 請求項39～41のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項59】 請求項42～44のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項60】 請求項45～47のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項61】 請求項48～50のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項62】 請求項51～53のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項63】 請求項54～56のいずれか記載のタンパク質に特異的に

結合する抗体。

【請求項 6 4】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 5 7 ～ 6 3 のいずれか記載の抗体。

【請求項 6 5】 請求項 7 ～ 1 1 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA を含むことを特徴とするベクター。

【請求項 6 6】 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 6 5 記載のベクター。

【請求項 6 7】 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 6 6 記載のベクター。

【請求項 6 8】 DNA が、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 6 9】 DNA が、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 0】 DNA が、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 1】 DNA が、請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 2】 DNA が、請求項 2 4 ～ 2 6 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 3】 DNA が、請求項 2 7 ～ 2 9 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 4】 DNA が、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 5】 請求項 6 5 ～ 7 4 のいずれか記載のベクターを宿主細胞に導入することにより得られることを特徴とする形質転換細胞。

【請求項 7 6】 宿主細胞が、植物細胞であることを特徴とする請求項 7 5 記載の形質転換細胞。

【請求項 77】 請求項 75 又は 76 記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清から組換えタンパク質を回収することを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項 78】 請求項 7～11 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA 又は請求項 65～74 のいずれか記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物。

【請求項 79】 環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 78 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 80】 化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 79 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 81】 DNA が、請求項 12～14 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 78～80 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 82】 DNA が、請求項 15～17 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 78～80 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 83】 DNA が、請求項 18～20 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 78～80 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 84】 DNA が、請求項 21～23 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 78～80 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 85】 DNA が、請求項 24～26 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 78～80 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 86】 DNA が、請求項 27～29 のいずれか記載の DNA であ

ることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8 7】 DNA が、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8 8】 請求項 7 8 ～ 8 7 のいずれか記載のトランスジェニック植物に由来することを特徴とする繁殖材料。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩ストレス等の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA 及びそのスクリーニング方法や、塩ストレス等の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、これら DNA やタンパク質の利用に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来技術】

自然界に存在する生物は塩ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス等の種々の環境ストレスに曝されている。特に、塩ストレスは多くの高等植物の生育を阻害する大きな要因の 1 つである。高等植物の耐塩性強化は、農産物生産の増大につながるため、遺伝子導入により高等植物の耐塩性を強化させる試みが、近年、活発に進められている。

【 0 0 0 3 】

例えば、H. J. Bohnert らは大腸菌由来のマニトール合成酵素をタバコに導入することで、タバコの耐塩性が強化された事を報告している (Science Vol.259, No.22, p508-510, 1993)。このような高等植物の耐塩性強化はプロリン合成系酵素 (Plant Physiol Vol.108, p1387-1394, 1995) やグリシンベタイン合成系酵素を導入することでも同様な効果が得られることが示されている (Plant J Vol. 12, p133-142, 1997, Plant Mol Biol Vol.38, 1011-1019, 1998)。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、これらの酵素をコードする遺伝子の導入で得られる組み換え植

物は、海水程度の塩水に対して十分に適応できるものではない。塩濃度の高い環境で安定に生育できる組み換え植物を作出するためには、既知の耐塩性関連遺伝子とは異なる、全く新しい「耐塩性に関与する遺伝子」の探索が必要である。そしてその探索には塩濃度の高い環境で生育できる植物（塩生植物）由来の遺伝子ライブラリーからの探索が効率的であると考えられている。また、耐塩性に関与する遺伝子は塩ストレスのみならず、その他の環境ストレス（熱、凍結、浸透圧、乾燥、紫外線）の全て、あるいはそれらのうちのいくつかのストレスに対する耐性を向上させる活性を有する可能性が期待できる。

【 0 0 0 5 】

一方、沿岸及び河口近くの高濃度の塩分を含む土壤に生息する樹木類にマングローブ植物がある。マングローブ植物は進化の過程で特殊な耐塩性機構を獲得したものと考えられることから、マングローブの耐塩性に関わる遺伝子群を単離できれば、高等植物の耐塩性の強化への応用が期待できる。しかしながら、マングローブ植物の耐塩性機構を遺伝子レベルで解析した例はこれまでに全く知られていない。かかる理由としては、このような樹木類から直接耐塩性に関与する遺伝子の mRNA を抽出することが極めて困難であったことが挙げられる。

【 0 0 0 6 】

近年、M i m u r a らがマングローブ植物の一種である *Bruguiera sexangula* の培養細胞系を確立した (J Res Vol.110, p25-29, 1997)。この培養細胞は懸濁培養が可能であり、また塩濃度 1 5 0 mM 以上の環境下でも安定に生育することができるといった、他の植物培養細胞とは異なる極めて特異的な性質を有している (J. Plant Res Vol.110, p31-36, 1997)。しかしながら、この培養細胞を利用してマングローブ植物の cDNA ライブラリーを構築し、マングローブ植物の耐塩性に関わる遺伝子群を探索しようとする試みさえも、これまで全く検討されていない。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する効果を有する遺伝子の効率のよいスクリーニング方法や、かかるスクリーニング方法により

得られる環境ストレス耐性を向上させる活性を有するタンパク質（環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質）の遺伝子や、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、耐塩性が増強されたトランスジェニック植物等を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため、本発明者らは塩生植物の一種であるマングローブに着目し、既に培養細胞系が確立されている *Bruguiera sexangula* の培養細胞の分与を得て、この細胞株を 100 mM の NaCl 存在下で培養し、培養細胞から抽出した mRNA を基に cDNA ライブラリーを作製し、この中からマングローブの耐塩性に関与する遺伝子の探索を試みた。通常、耐塩性関連遺伝子をスクリーニングする方法としては、ディファレンシャルスクリーニング法が広く利用されている（塩ストレスにより誘導される新規チオニン遺伝子に関する特開平 10-295380 号公報参照）が、このスクリーニング方法で単離される遺伝子は、ストレス条件下で特異的に誘導される遺伝子であり、その遺伝子を他の細胞で発現させることでその細胞のストレス耐性を強化できるとは限らない。そこで、本発明者らはストレス耐性に関与する遺伝子の探索に大腸菌の遺伝子発現系を利用する方法を新たに開発した。

【0009】

大腸菌の遺伝子発現系を利用して、耐塩性に関与する遺伝子をスクリーニングする場合、大腸菌自身の塩化ナトリウム（NaCl）に対する防御機構が強く働くことが問題になる。現在、分子生物学の分野で広く利用されている DH5 α 、HB101、JM109 等の大腸菌は 1000 mM 以上の NaCl を含む 2YT 寒天培地でもコロニー形成能を有する。これらの株を用いて上記のスクリーニングを行った場合、上記 cDNA ライブラリー由来の候補 cDNA の発現により耐塩性が強化されたクローンの他に、大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働くことで耐塩性に全く関与しない cDNA が導入されたクローンも得られてしまうことになり、これら両者の明確な判別は極めて困難である。このような理由から、大腸菌の遺伝子発現系を利用して耐塩性関連遺伝子の選抜はこれまで全く行われてい

なかった。本発明者等は、他の大腸菌と比べ、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌を見出し、これを利用することで、初めて大腸菌を利用した耐塩性関連遺伝子のスクリーニングを行なうことに成功した。

【0010】

本発明者らによる上記方法で単離したマングローブ由来の遺伝子 (cDNA) 群は、それぞれ大腸菌の耐塩性を強化する機能を有することが確認された。植物遺伝子を異種生物である大腸菌で発現させて、該大腸菌の耐塩性を向上させることができたため、これらの遺伝子群は、原核生物から真核生物にいたる幅広い生物群で、耐塩性を強化する機能を有するものと考えられた。実際、本発明者らは、*mang1* 遺伝子と命名した単離したストレス耐性に関与する遺伝子群の中の1つの遺伝子を導入することにより、酵母、植物細胞 (タバコ培養細胞)、そして植物体 (タバコ) の耐塩性を強化させることにも成功した。また、*mang1* は耐塩性の他に、熱、浸透圧、凍結等の環境ストレスに対する耐性を強化する機能を有することも確認された。本発明はかかる一連の研究に基づいて完成するに至ったものである。

【0011】

すなわち本発明は、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする方法であって、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離することを特徴とするスクリーニング方法 (請求項1) や、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項1記載のスクリーニング方法 (請求項2) や、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項2記載のスクリーニング方法 (請求項3) や、宿主細胞が、大腸菌であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のスクリーニング方法 (請求項4) や、大腸菌が、SOLR株であることを特徴とする請求項4記載のスクリーニング方法 (請求項5) や、宿主

細胞が実質的に生育できない環境条件下が、350 mM以上の塩濃度の条件下であることを特徴とする請求項5記載のスクリーニング方法（請求項6）に関する。

【0012】

また本発明は、請求項1～6のいずれか記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項7）や、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項7記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項8）や、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項8記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項9）や、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質が、植物由来のタンパク質であることを特徴とする請求項7～9のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項10）や、植物が、マングローブ（*Rhizophora mangle*）であることを特徴とする請求項10記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項11）や、以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項12）や、配列番号1に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA（請求項13）や、請求項13記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項14）や、以下の(a)～(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号

4に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項15)や、配列番号3に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項16)や、請求項16記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項17)や、以下の(a)~(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項18)や、配列番号5に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項19)や、請求項19記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項20)や、以下の(a)~(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項21)や、配列番号7に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項22)や、請求項22記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項23)や、以下の(a)~(c)のいずれか記載のタンパク

質をコードするDNA(a)配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号10に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号10に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項24)や、配列番号9に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項25)や、請求項25記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項26)や、以下の(a)~(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号12に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項27)や、配列番号11に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項28)や、請求項28記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項29)や、以下の(a)~(c)のいずれか記載のタンパク質をコードするDNA(a)配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号14に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(c)配列番号14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質(請求項30)や、配列番号13に示される塩基配列若しくはその相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNA(請求項31)や、請求項31記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ少

なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA（請求項32）に関する。

【0013】

また本発明は、請求項7～32のいずれか記載のDNAを用いることを特徴とする環境ストレス耐性の向上方法（請求項33）や、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項33記載の環境ストレス耐性の向上方法（請求項34）や、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項34記載の環境ストレス耐性の向上方法（請求項35）に関する。

【0014】

また本発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項36）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項37）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項38）や、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項39）や、配列番号4に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項40）や、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項41）や、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項42）や、配列番号6に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項43）や、配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質（請求項

44) や、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (請求項 45) や、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と相同性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 46) や、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 47) や、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (請求項 48) や、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列と相同性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 49) や、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 50) や、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (請求項 51) や、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列と相同性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 52) や、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 53) や、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質 (請求項 54) や、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列と相同性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 55) や、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質 (請求項 56) に関する。

【0015】

また本発明は、請求項 36～38 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体 (請求項 57) や、請求項 39～41 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体 (請求項 58) や、請求項 42～44 のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体 (請求項 59) や、請求項 45～47 のいずれか

記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項60）や、請求項48～50のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項61）や、請求項51～53のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項62）や、請求項54～56のいずれか記載のタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項63）や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項57～63のいずれか記載の抗体（請求項64）に関する。

【0016】

また本発明は、請求項7～11のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを含むことを特徴とするベクター（請求項65）や、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる1又は2以上のストレスであることを特徴とする請求項65記載のベクター（請求項66）や、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項66記載のベクター（請求項67）や、DNAが、請求項12～14のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項68）や、DNAが、請求項15～17のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項69）や、DNAが、請求項18～20のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項70）や、DNAが、請求項21～23のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項71）や、DNAが、請求項24～26のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項72）や、DNAが、請求項27～29のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項73）や、DNAが、請求項30～32のいずれか記載のDNAであることを特徴とする請求項65～67のいずれか記載のベクター（請求項74）に関する。

【0017】

また本発明は、請求項65～74のいずれか記載のベクターを宿主細胞に導入

することにより得られることを特徴とする形質転換細胞（請求項 7 5）や、宿主細胞が、植物細胞であることを特徴とする請求項 7 5 記載の形質転換細胞（請求項 7 6）や、請求項 7 5 又は 7 6 記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清から組換えタンパク質を回収することを特徴とする環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法（請求項 7 7）に関する。

【 0 0 1 8 】

また本発明は、請求項 7 ～ 1 1 のいずれか記載の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA 又は請求項 6 5 ～ 7 4 のいずれか記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られることを特徴とするトランスジェニック植物（請求項 7 8）や、環境ストレスが、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上のストレスであることを特徴とする請求項 7 8 記載のトランスジェニック植物（請求項 7 9）や、化学物質ストレスが、塩ストレスであることを特徴とする請求項 7 9 記載のトランスジェニック植物（請求項 8 0）や、DNA が、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 1）や、DNA が、請求項 1 5 ～ 1 7 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 2）や、DNA が、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 3）や、DNA が、請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 4）や、DNA が、請求項 2 4 ～ 2 6 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 5）や、DNA が、請求項 2 7 ～ 2 9 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 6）や、DNA が、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか記載の DNA であることを特徴とする請求項 7 8 ～ 8 0 のいずれか記載のトランスジェニック植物（請求項 8 7）や、請求項

78～87のいずれか記載のトランスジェニック植物に由来することを特徴とする繁殖材料（請求項88）に関する。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAのスクリーニング方法は、cDNAライブラリー由来の候補cDNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下で培養し、培養後に生育しているクローンを選択し、選択されたクローンから導入した候補cDNAを単離することを特徴とする。

【0020】

上記環境ストレスとしては、環境要因に基づくストレスであればどのようなストレスでもよく、具体的に、化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレス等を例示することができ、これら環境ストレスは、単独要因に基づくストレスであっても、複数の要因に基づくストレスであってもよい。また、化学物質ストレスとしては、化学物質に起因するストレスであれば特に制限されるものではないが、塩ストレスや毒性物質ストレスを例示することができる。

【0021】

上記cDNAライブラリーとしては、環境ストレスに関与する遺伝子のcDNAが含まれるものであれば、植物・動物・微生物等由来する生物種など特に制限されるものではない。例えば、塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAをスクリーニングする場合、塩生植物、例えば、マングローブ（ハマザクロ、オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ、ヒルギモドキ、ヒルギダマシ、ニッパヤシ）、マツバギク、シチメンソウ、ウラギク、アッケシソウ、マツナ、ハマアカザ等の生物種より調製したcDNAライブラリーを用いることができる。また、cDNAライブラリーの調製方法としては、当業者に公知の方法であればどのような方法でもよい。例えば、実施例に記載のように、細胞からの全mRNAの抽出は、Ostreimらの方法（Plant Physiol V 1.84, p1270-1275

、1987)に従って調製することができ、また、調製したmRNAからのpoly (A) + RNAの精製は、Oligotex-dT30<super> (第一化学社)を用いて行なうことができる。cDNAライブラリーは、精製したpoly (A) + RNAを基に、ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit (Stratagene社)を利用して構築することができる。

【0022】

上記cDNAライブラリーに由来するスクリーニング対象となる候補cDNAが導入される宿主細胞としては、細菌や酵母等の微生物細胞や、動植物細胞を例示することができるが、宿主-ベクター系に関する知見が確立している大腸菌、枯草菌、サッカロミセス・セルビツシェ、BHK細胞等の動物細胞などが好ましく、中でもかかる知見が豊富で、生育が早く、取り扱いが容易な大腸菌が好ましい。また、宿主細胞としては、cDNAライブラリー由来の候補cDNAが導入された形質転換細胞は生育しうる環境条件下において、実質的に生育できない細胞、例えば塩感受性細胞や、熱塩感受性細胞等が好ましく、かかる細胞は野生株からのスクリーニングにより、あるいは野生株を変異処理することにより調製することができる。

【0023】

次に、形質転換細胞は、上記宿主細胞へcDNAライブラリー由来の候補cDNAを導入することによって行われるが、かかる導入方法としてはトランスフォーメーション法、エレクトロポレーション法など公知の遺伝子導入方法であれば特に制限されるものではない。そして、候補cDNAが導入された形質転換細胞は、前記宿主細胞が実質的に生育できない環境条件下、例えば、高塩濃度条件下、高温条件下、乾燥条件下で培養される。続いて、培養後に生育しているクローンが公知の方法により選択され、選択されたクローンから導入した候補cDNAが公知の方法により単離することができる。

【0024】

本発明のスクリーニング方法を、以下、環境ストレスが塩ストレスであり、宿主細胞が大腸菌である場合を例に挙げてより具体的に説明する。宿主細胞として用いられる大腸菌としては、耐塩性機構の働きが低下した大腸菌が好ましく、塩

に対する最小生育阻害濃度が低い大腸菌がより好ましい。例えば、750 mM以上、好ましくは500 mM以上、より好ましくは350 mM以上のNaClを含む培地中でコロニー形成が抑制される大腸菌を用いることが、耐塩性関連遺伝子のスクリーニング効率を向上させることができるので好ましい。かかるNaCl感受性的大腸菌として、低濃度の塩（350 mM以上のNaCl）を含む寒天培地上でほとんど生育できないことが本発明者らにより見いだされた大腸菌の一種であるSOLR株（TOYOBO社、Stratagene社、理研ジーンバンク等から市販されている）を具体的に挙げるができる。このSOLR株を用いる場合、候補cDNAの導入は、前記ZAP-cDNA/Gigapack Cloning Kit（Stratagene社）に含まれているSOLR株とExAssist helper phageによるin vivo excision systemを利用することができ、これらの操作は全て上記のキットの手引き書に従うことで容易に行うことができる。

【0025】

このようにして得られた候補cDNAが導入されたSOLR株を、約400 mMのNaClを含む培地で培養を行ない、生育した細胞を選択することにより、耐塩性タンパク質をコードするDNAで形質転換されたクローンを選抜することができる。かかるクローンの選抜は、例えば、寒天培地等で37℃で8～20時間培養し、寒天培地上に形成されるコロニーを選択すればよい。選抜されたクローンからのcDNAの単離は、例えば、文献（Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1987))）に示された方法により、プラスミドDNAを抽出することにより行うことができる。

【0026】

また、目的とする形質転換大腸菌を得るためのスクリーニングは、複数回繰り返して行なうこともできる。例えば、cDNAライブラリーが導入された大腸菌を、まず、最小生育阻害濃度の塩を含む培地で培養して、この条件で生育するクローンを選抜する（一次スクリーニング）。次いで、選抜したクローンからcDNAを単離し、これを大腸菌に再度導入して、最小生育阻害濃度よりも高い塩を含む培地で該大腸菌を培養し、この条件で生育するクローンを選抜する（二次ス

クリーニング)。このようにスクリーニングを繰り返すことで、塩耐性関連遺伝子の単離の効率を高めることができる。

【0027】

本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAは、上記スクリーニング方法により得られるDNAであれば特に制限されるものではなく、例えば、塩ストレス等の化学物質ストレス、熱ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなどの1又は2以上のストレスに対する耐性を向上させる活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。そして特に、塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、植物由来、好ましくはマングローブ (*Bruguiera sexangula*) 由来のDNAを例示することができる。そして、かかるマングローブ由来の塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列表の配列番号1、3、5、7、9、11又は13に示される塩基配列を有するDNAを具体的に例示することができる。

【0028】

本発明のDNAとしては、上記配列表の配列番号1、3、5、7、9、11又は13に示される塩基配列若しくはそれらの相補的配列又はこれらの配列の一部若しくは全部を含むDNAや、かかるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。これらのDNAを各種生物に導入することで耐塩性等が強化されたという報告はこれまでになく、本発明者等により初めて見出されたものである。

【 0 0 2 9 】

本発明のタンパク質としては、配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列と相同性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を挙げることができる。

【 0 0 3 0 】

上記配列番号 8 及び 14 に示したアミノ酸配列は、タンパク質の全長をコードしたものではないと考えられるが、それ自体に塩ストレス耐性を強化させる活性が存在したため、それぞれの全長タンパク質の機能領域であるといえる。本発明は、上記のように、これら機能領域を含む全長タンパク質および該全長タンパク質をコードする DNA を含むものである。そして、部分長 cDNA を基に全長 cDNA を単離する方法としては、例えば、Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech 社)、3'-Full RACE Core Set (宝酒造社)、5'-Full RACE Core Set (宝酒造社) 等のキットを用い、それらの手引き書に従うのが適当である。

【 0 0 3 1 】

上記のように、本発明には、配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA が包含される。一般に、生理活性を有するタンパク質で、少数のアミノ酸が置換、欠失、挿入があっても、その生理活性が維持される場合があることはよく知られており、また、タンパク質中のアミノ酸を変異させる公知の種々の方法もよく知られている上に、既にいくつかのキットも市販されている。例えば、変異を導入したプライマーを合成し、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いれば容易にタンパク質中のアミノ酸を変異させることが可能である。

【 0 0 3 2 】

また、上記のように、配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質であっても、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有すれば、それらは全て本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 3 3 】

また、配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA は、ハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術（Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)）によっても調製することが可能である。例えば、配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする配列番号 1、3、5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列の全部若しくは一部をプローブとして、各種生物由来の DNA ライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズする DNA を単離することにより、目的とする少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA 等を得ることができる。

【 0 0 3 4 】

このような DNA を取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び 1×SSC、0.1%の SDS を含む洗浄バッファーによる 42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び 0.1×SSC、0.1%の SDS を含む洗浄バッファーによる 65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【 0 0 3 5 】

また、配列番号 1、3、5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列の情報を基に調製したオリゴヌクレオチドをプライマーとして各種生物由来の DNA（または RNA）を鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行なうことによっても、目的とする少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードする DNA 等を得ることができる。本発明には、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を含む環境ストレス耐性を強化する活性を有する限り、このようなハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術を利用して単離しうる DNA も含まれる。

【 0 0 3 6 】

上記配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有すると考えられる。高い相同性とは、70%以上、好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性をいう。本発明には、前記のように、このように配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示されるアミノ酸配列とそのアミノ酸配列において高い相同性を有し、各種生物細胞（例えば、植物細胞、大腸菌、酵母など）の少なくとも塩ストレス耐性を強化する活性を有するタンパク質をコードする DNA が含まれる。例えば、配列番号 2 のアミノ酸配列は 1 から 86 番目のアミノ酸を含む領域が塩ストレス耐性を強化する活性を有することから、例えばこの領域を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子 DNA は全て本発明の範囲に含まれる。配列の相同性は、例えば、遺伝情報処理ソフトウェアの GENETYX-MAC（ソフトウェア開発株式会社）のマルチアライン機能を利用することにより決定できる。

【 0 0 3 7 】

本発明の環境ストレス耐性の向上方法としては、上記本発明の DNA、すなわち塩ストレス等の化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスから選ばれる 1 又は 2 以上の環境ストレスに対する耐性を向上させる活

性を有するタンパク質をコードするDNAを用いる方法であれば特に制限されるものではなく、この環境ストレス耐性の向上方法により、植物・動物及びそれらの組織、器官、細胞並びに細菌、酵母、カビ等の微生物の環境ストレス耐性を向上させることができる。

【0038】

本発明の塩ストレス等の化学物質ストレス、熱ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなどの1又は2以上の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体としては、前記本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体であればどのようなものでもよく、かかる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列と相同性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質や、配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも塩ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を抗原として用いて作製することができる。これら抗体は、例えば、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の分子機構を明らかにする上で有用である。

【0039】

上記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質又はエピトープを含む断片、類似体若しくは細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ技法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ技法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985）など任意の技法を用い

ることができる。

【0040】

本発明の上記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニック植物又はトランスジェニック動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。

【0041】

本発明のベクターとしては、塩ストレス等の化学物質ストレス、高温ストレス、低温ストレス、凍結ストレス、乾燥ストレス、オゾンストレス、紫外線ストレス、放射線ストレス、浸透圧ストレスなど前記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNAを含むベクターであれば特に制限されるものではない。また、本発明の形質転換細胞としては、かかるベクターを植物細胞等の宿主細胞に導入することにより得られるものであれば特に制限されるものではない。そしてまた、本発明の環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法としては、上記本発明の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞又はその培養液の上清から組換えタンパク質を回収する方法であれば特に制限されるものではない。さらに、本発明のトランスジェニック植物としては、前記環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質をコードするDNA又は前記ベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞の分裂・増殖と再分化を行わせることにより得られるものであれば特に制限されるものではない。以下、上記本発明のベクター、形質転換細胞、環境ストレス耐性向上活性を有するタンパク質の製造方法、及びトランスジェニック植物について説明する。

【0042】

上記のように、本発明のDNAは組換えタンパク質の調製に利用することができる。組換えタンパク質の調製は、上記本発明のDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入して、該DNAを発現させ、次いで

、発現させたタンパク質を該形質転換細胞又はその培養上清から回収することにより行うことができる。組換えタンパク質の発現に用いられる宿主-ベクター系としては、例えば、IMPACT-CN System (宿主: E. coli strain ER2566、ベクター: pTYB1、pYB2、pYB11、pYB12 (BioLabs社))、あるいはpET Expression System (宿主: Epicurian Coli BL21、ベクター: pET3シリーズ (Novagen社)) が挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入法としては、当業者に公知の方法、例えば、エレクトロポレーション法やヒートショック法が挙げられる (遺伝子ライブラリーの作製法、羊土社 (1994)、植物細胞工学入門、学会出版センター (1998))。また、組換えタンパク質を発現させるための形質転換体の培養は、当業者に一般的に用いられている方法および条件にて行なうことができる。発現させたタンパク質は、例えば、IMPACT-CN Systemを利用した場合にはキチンビーズ (BioLabs社) で、pET Expression Systemを利用した場合にはHis Bind Resin (Novagen社) により精製できる。

【0043】

上記本発明のDNAは、また、少なくとも塩ストレス耐性が強化されたトランスジェニック生物の作出に利用できる。本発明のDNAを用いてトランスジェニック生物を作出する生物種としては特に限定されるものではないが、用いる遺伝子がマングローブに由来する場合には、高等植物であることが好ましい。かかるトランスジェニック植物の作出は、該DNAを植物細胞内でその発現を保証するベクターに挿入し、これを植物細胞に導入し、トランスジェニック植物を得るために該形質転換植物細胞を再生させることにより有利に行うことができる。

【0044】

トランスジェニック植物の作出に用いられるベクターとしては、例えば、東洋紡から市販されているpBI101、あるいはpIG121Hm (Plant J, Vol 6, p271-282 (1994)) を好適に用いることができる。ベクターを導入する植物細胞の種類に特に制限はないが、例えばイネ、小麦、トウモロコシ、大豆、タバコ、ニンジン等が考えられる。植物細胞の形態としては、例えば、プロトプラスト、カルス、植物体の部分 (リーフディスク、ヒポコチル等) がある。宿主植物細胞へのベクターの導入法としては、アグロバクテリウム法が好適であるがその他にも、例えば、ポ

リエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などを用いることができる（モデル植物の実験プロトコール、秀潤社（1996））。

【0045】

ベクターの導入された植物細胞を植物体へ再生させる方法は、植物種により異なる。例えば、イネの場合、以下のようにして行なうことができる。完熟種子からカルス誘導を行い、これにcDNAを導入したアグロバクテリウムを感染させる。共存培養を経て、選抜培地に移し培養する。約3週間後カルスを再分化培地に移し、再分化するまで培養する。4、5日馴化させた後ポットに移すことで形質転換体を再生させる（モデル植物の実験プロトコール、秀潤社（1996））。また、ニンジン、タバコ等の再生の方法としては、それぞれ加藤、庄野博士等の方法（植物組織培養の技術 朝倉書店（1983））が適当である。

【0046】

本発明のトランスジェニック植物に由来する繁殖材料としては、上記トランスジェニック植物体に由来する繁殖材料であればどのようなものでもよく、例えば、植物の種類に応じて、種子、塊根、切穂、メリクローン等の培養増殖材料を挙げることができる。また、かかる繁殖材料を基に本発明のトランスジェニック植物を量産することが可能である。

【0047】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1 マングローブcDNAライブラリーの作製

マングローブ懸濁培養細胞は、Mimuraらが確立したBruguiera sexangulataの懸濁培養細胞系（J Plant Res Vol.110, p25-29（1997））を用いた。この培養細胞は100mMのNaClを含むAA培地を用い、500mlフラスコに120mlの分量で、26℃、暗所で往復振とう培養（70rpm）した。マングローブのcDNAライブラリーは、この懸濁培養細胞を用い、以下に示す手順で行った。まず、Ostremらの方法（Plant Physiol Vol.84p1270-1275（1987））に従って全mRNAを抽出し、ここからOligo-dT30<super>（第一化学社）

を用いpoly (A) + RNAを精製した。精製したpoly (A) + RNAを基にcDNAを合成し、λ Zap II (Stratagene社) ラムダファージベクターに導入してcDNAライブラリーを構築した。λ Zap IIを用いたcDNAライブラリーの構築方法は周知の方法であり、実際の手順はStratagene社の手引き書に従った。その結果、 10^6 の独立クローンを含むマングローブcDNAライブラリーの構築に成功した。

【0048】

実施例2 耐塩性に関するcDNAのスクリーニング条件の決定

マングローブcDNAライブラリーの中から耐塩性に関するcDNAのスクリーニング方法として本発明者らは大腸菌の遺伝子発現系を利用した。即ち、大腸菌にマングローブcDNAを導入し、耐塩性が強化された形質転換大腸菌を選抜することで、耐塩性に関わるcDNAを獲得する新規な方法を開発した。耐塩性が強化された形質転換大腸菌の選抜には、適当な濃度のNaClを含む2YT寒天培地を用いた。このスクリーニングを開始するにあたり、本発明者らは、上記のスクリーニングに適した宿主大腸菌の選別を目的とし、各種大腸菌(DH5α, JM109, HB101, SOLR)のNaClに対する最小生育阻害濃度を決定した。これら的大腸菌は周知の株であり、TOYOBO社やStratagene社等から市販されているものである。DH5α, JM109, 及びHB101は1200mMのNaClを含む2YT寒天培地上で、著しく生育が阻害されるものの、コロニー形成を行うことが可能であり、1500mMのNaClでその生育が完全に抑制される。これに対し、SOLRは300mMのNaClで著しく生育が抑制され、400mMのNaClでその生育が完全に抑制される。このことから、SOLRは塩感受性の高い株であり、他の大腸菌と異なり、強力な耐塩性機構を持たないことが明らかとなった。宿主大腸菌自身の耐塩性機構が強力に働かないことは、上記のスクリーニングを行う上で非常に有効である。よって、cDNAライブラリーからの耐塩性に関するcDNAのスクリーニングは、宿主大腸菌としてSOLRを用い、選択寒天培地のNaCl濃度を400mMに設定し、以下に示す手順でスクリーニングを行った。

【0049】

実施例3 マングローブcDNAライブラリーからの耐塩性に関するcDNAのスクリーニング

マングローブcDNAライブラリーをin vivo excision system (Stratagene社)により、pBluescript SK に組み込んだ形でSOLRに導入した。遺伝子導入は、ZAP-cDNA /Gigapack Cloning Kit (Stratagene社)の手引き書に従って行なった。マングローブcDNAが導入されたSOLRの中から耐塩性関連のcDNAが導入されたSOLRを選抜するために本発明では以下に示す2段階スクリーニングを行った。一次スクリーニングは、マングローブcDNAが導入されたSOLRを400mMのNaCl、50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンプシリン、0.05mMのIPTGを含む2YT寒天培地に植菌し、20時間、37℃で培養した。この条件で得られたコロニー全てを再度、上記の寒天培地に植菌し、それらの生育を観察した。その結果、耐塩性が強化された168個のクローンを獲得した。これらのクローンの中には何らかの原因で宿主大腸菌由来の耐塩性機構が強化されている可能性が考えられたため、以下に示す二次スクリーニングを行った。

【0050】

一次スクリーニングで得た各クローンからプラスミドを抽出し、これらを全てSOLRに再導入した。新たに得られた形質転換体は、50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンプシリン、0.05mMのIPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で希釈シリーズを作製し、上記の寒天選択培地に25μlずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、37℃で一晩培養した。この結果、30のクローンに明らかな耐塩性の向上が確認された。代表例として、図1に配列番号1に示したcDNAが導入された大腸菌のスポット実験の結果を示す。次に、この30クローンに導入されたcDNAの塩基配列をThermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham社)及びDNAシーケンサーLIC-4000L (LICOR)を用い、製造者の手引き書に従って決定した。その結果、30個のクローンから得られたcDNAは7種類に分類できた。即ち、配列番号1に示したcDNAを23個、配列番号3に示したcDNAを1個、配列番号5に示したcDNAを2個、

配列番号7に示したcDNAを2個、配列番号9に示したcDNAを1個、配列番号11に示したcDNAを1個、配列番号13に示したcDNAを1個を獲得した。BLAST相同性検索プログラムを用い、これらのDNAがコードするアミノ酸配列の相同性検索を行った。

【0051】

その結果、配列番号2に示されるアミノ酸配列はSwiss protein, PIR等のデータベース中に相同性を有するタンパク質が登録されていないことから、新規のタンパク質と考えられた。そこで、本願発明者らはこのcDNAがコードする新規のタンパク質（総アミノ酸数、141）をマングリン（mangrin）、この遺伝子をmang1と命名した。次に、マングリンの機能領域の決定を試みた。16, 42, 65, 87, 109, 142番目のアミノ酸に終止コドンを導入したサブクローンを作製し、これをSOLRに導入して上記のスロット実験を行った結果、1から86番目のアミノ酸配列が耐塩性強化に関わる領域であることが明らかとなった（図2）。

【0052】

配列番号4に示されるアミノ酸配列はArabidopsis thalianaのt-complex polypeptide 1 (pir JN0448) と約90%の相同性を有した。配列番号6に示されるアミノ酸配列は、Ricinus communisのMetallothionein-like protein TYPE 2 (EMBL L02306) と約80%の相同性を有した。配列番号8に示されるアミノ酸配列はHomo sapiensのRubB-like DNA helicase (AB024301) と約63%の相同性を有した。配列番号10に示されるアミノ酸配列はRattus norvegicus のRibosomal protein S29 (pir S30298) 約45%の相同性を有した。配列番号12に示されるアミノ酸配列はZea maysのElongation factor eEF-1 alpha chain (pir S66339) と約90%の相同性を有した。配列番号14に示されるアミノ酸配列のSchizosaccharomyces pombeのcdc21 (pir S26640) と約70%の相同性を有した。配列番号2、4、6、8、10、12又は14に示したタンパク質をそれぞれコードする配列番号1、3、5、7、9、11又は13に示されるcDNAは、実際に大腸菌の耐塩性を向上させる機能を有することから大腸菌等の原核生物から高等植物を含む幅広い生物群の耐塩性を強化する機能を有するものと考えられる。

【0053】

実施例4 酵母におけるマングローブcDNAの効果

配列番号1に示したcDNAがクローニングされたpBluescript SKを制限酵素EcoRI, NotIで切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約1 kbの断片を切り出し、GENECLEAN Kit (BIO101社)で精製した。これをLigation Kit ver2 (宝酒造)を用い、制限酵素EcoRI, NotIで切断した、酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen)に導入した。次に、これをエレクトロポレーション法により酵母に導入した。酵母は*Saccharomyces cerevisiae* YMA4271 (Clontech社)を使用した。形質転換酵母の選択にはウラシルを含まないSD寒天培地(以下、-UraSD寒天培地)を用いた。形質転換酵母の耐塩性の評価は以下のように行った。対数増殖期後期まで-UraSD培地で培養した形質転換酵母を1200 mMのNaClを含む-UraSD培地、及びNaClを含まない-UraSD培地に植菌(初期濃度OD600=0.1)し、30℃で振とう培養を開始した。24時間ごとに細胞懸濁液を採取し、その吸光度を測定した。吸光度の測定には島津製作所のUV-1200を利用した。比較としてベクターであるpYES2のみを導入した酵母についても同様な検討を行った。その結果を図3に示した。図3からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは酵母においても、大腸菌の場合と同様に耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

【0054】

実施例5 タバコ培養細胞におけるマングローブcDNAの効果

配列番号1に示したcDNAがクローニングされているpBluescript SKを制限酵素XbaI, XhoIで切断し、これをアガロースゲル電気泳動した。ここで得られた約1 kbの断片を切り出し、GENECLEAN Kit (BIO101)で精製した。これをLigation Kit ver2 (宝酒造社)を用い、植物発現ベクターpBI101 (EMBOJ Vol6, p3901-3907(1987))の制限酵素EcoRI, NotIサイトに導入した。得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコ培養細胞(*Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2)に感染させた。アグロバクテリウムを用いた植物細胞への遺伝子

導入法は周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムに *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 を用い、An の方法 (Plant Physiol Vol.79, p568-570(1985)) に従った。形質転換タバコ培養細胞の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコ培養細胞のカルスを拾い、Lins-Mayer 培地で対数増殖期後期まで培養した。これを NaCl 濃度 0, 100, 及び 150 mM となるように調整した 45 ml の Lins-Mayer 培地にそれぞれ 1 ml の割合で植え継ぎ、26℃で振とう培養を開始した。培養開始後、7日または13日目の細胞懸濁液から細胞を回収し、その湿重量を測定した。比較として、マングローブ cDNA のかわりに、pBI101 を用いて GUS 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。その結果を図4に示す。図4からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA はタバコ培養細胞においても大腸菌の場合と同様に、耐塩性を強化する機能を有することが確認された。

【0055】

実施例6 タバコ（植物体）におけるマングローブ cDNA の効果

実施例5で得られたプラスミドをエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウムに導入し、これをタバコリーフディスクに感染させた。アグロバクテリウムを用いたタバコリーフディスクへの遺伝子導入法は周知の方法である。ここでは、アグロバクテリウムに *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 を用い、植物細胞工学入門（学会出版センター（1998））記載の方法に従った。形質転換タバコ（植物体）の耐塩性の評価は以下のように行った。形質転換タバコを NaCl 濃度 150 mM となるように調整した MS 寒天培地に植え継ぎ、26℃、明暗周期の光照射下（明：16時間／暗：8時間）で培養した。培養開始30日後の植物体の生育を観察し、その耐塩性を評価した。マングローブ cDNA のかわりに、pBI101 を用いて GUS 遺伝子を導入したタバコ培養細胞についても同様な検討を行った。その結果を図5に示す(参考写真参照)。図5からも明らかなように、スクリーニングの結果得られた cDNA を導入したタバコ植物体は、NaCl 存在下においても根、葉、茎の生長が良好であった。このことから、スクリーニングの結果得られた cDNA は植物体レベルにおいても耐塩性強化機能を有することが確認された。

【0056】

実施例7 各種環境ストレスに対するマングローブcDNAの効果

(1) 熱ストレス

配列番号1に示したcDNAがクローニングされているpBluescript SKが導入されたSOLRを50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンピシリン、0.05mMのIPTGを含む2YT液体培地で37℃、および40℃で培養した。対照としてベクターであるpBluescript SKが導入されたSOLRについても同様な検討を行った。その結果を図6に示した。図6からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは耐熱性を強化する機能を有することが確認された。

【0057】

(2) 浸透圧ストレス

配列番号1に示したcDNAがクローニングされているpBluescript SKが導入されたSOLRを50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンピシリン、0.05mMのIPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で希釈シリーズを作製し、800mMの2YT寒天選択培地に25μlずつスポットした。液体が乾くまで風乾した後、37℃で一晩培養した。その結果を図7に示した。図7からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは浸透圧耐性を強化する機能を有することが確認された。

【0058】

(3) 凍結ストレス

配列番号1に示したcDNAがクローニングされているpBluescript SKを導入したSOLRを50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンピシリン、0.05mMのIPTGを含む2YT液体培地で対数増殖期になるまで培養し、これを2YT液体培地で5000cells/25mlになるように希釈した。これをプラスチックチューブに移し、3分間の液体窒素による凍結と37℃、10分間の融解を繰り返した。融解時の菌体懸濁液の一部(25ml)を採取し、SOLRを50mg/mlのカナマイシン、50mg/mlのアンピシリン、

0.05 mMのIPTGを含む2YT寒天培地にスポットした。比較としてベクターであるpBluescript SKが導入されたSOLRについても同様な検討を行った。その結果を図8に示した。図8からも明らかなように、スクリーニングの結果得られたcDNAは凍結ストレスに対する耐性を強化する機能を有することが確認された。

【0059】

【発明の効果】

本発明は、各種生物の環境ストレスに対する耐性を強化する有効な手段になる。特に環境ストレス耐性が強化された植物はこれまで生育が困難であった塩害土壌、寒冷地、砂漠、海洋での生育が促進され、これにより、農地の拡大による農産物生産の増加が期待できる。また、環境ストレス耐性が強化された植物は、緑地環境の増大や砂漠緑化につながると同時に、地球規模においてCO₂濃度の増大による地球温暖化現象の抑制に貢献するものである。

【0060】

【配列表】

----- SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Screening of genes to give tolerance against
environmental stress and the applications

<130> 11-337

<140>

<141>

<150> JP P1999-235910

<151> 1999-07-19

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1018

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (42)..(464)

<400> 1

gtccaaacag ccagagagaa acgacaacat cgaccaagaa a atg gct ctt tca agc 56

Met Ala Leu Ser Ser

1

5

tct gct ctg aga acc gtc tct tct tct gtg aag gtg gtc ggc cct gca 104

Ser Ala Leu Arg Thr Val Ser Ser Ser Val Lys Val Val Gly Pro Ala

10

15

20

aga tca aag agt gct act gta ccc acc caa aca gta ttg cct ttc aag 152

Arg Ser Lys Ser Ala Thr Val Pro Thr Gln Thr Val Leu Pro Phe Lys

25

30

35

ttc aca aac ccg tcg tta ctc act cga tcg cta agc ttt tca tca aaa 200

Phe Thr Asn Pro Ser Leu Leu Thr Arg Ser Leu Ser Phe Ser Ser Lys

40

45

50

ggt tca agc ttt gac agc ttc tct gta ccc aaa aga tct ttt tct tgc 248

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Phe Ser Val Pro Lys Arg Ser Phe Ser Cys

55

60

65

aga agc caa gcc act cca tct gat gat gcc tca aga ccc acc aaa gtt 296

Arg Ser Gln Ala Thr Pro Ser Asp Asp Ala Ser Arg Pro Thr Lys Val

70

75

80

85

caa gag ctg tgt gtg tat gag atg aac gag aga gat cgt gga agc cct 344

Gln Glu Leu Cys Val Tyr Glu Met Asn Glu Arg Asp Arg Gly Ser Pro

90

95

100

gct gtt ctc cgg ttg agc cag aaa cct gtt aat tct ctc ggc gat ctc 392

Ala Val Leu Arg Leu Ser Gln Lys Pro Val Asn Ser Leu Gly Asp Leu

105

110

115

gtg cct ttc agt aac aaa gtt tac agc gga gac ctg cag aag cga att 440

Val Pro Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Gly Asp Leu Gln Lys Arg Ile

120

125

130

gga gta acc gca gaa tat gca tcc tgatccaaaa caagccagaa aaaaagggtg 494

Gly Val Thr Ala Glu Tyr Ala Ser

135

140

atcgctttga agcgatatat agctttttatt tcggtggcta tggtcacatt gctgtgcaag 554

gcgcatactt gacctacgag gacacgcacc ttgctgtgac gggcgggtcg ggcatatttg 614

aaggagtgtc tggtcagggtt aagctgcagc aactcgtgta ccctttcaag ctcttctaca 674
 ctttctactt gcgaggcatc aaggacttgc cggaggagct tacgaagaag ccggttgagc 734
 cccacccttc tgttgagccg atgccggcgg ccaaggcttg cgagccacat gccgttggtg 794
 ctaatttcac cgattagtga ttaattgtcc ttttgggggtt cgatgaact tgagttagct 854
 tacagttgca caacgttatg gcgcgagaca cgagaggga ccttagccat aagaaaatta 914
 ataatctcac ggtgctttta ttttgattct tctattagtt gaatcgtaa tgaaagtgga 974
 ccaaattggc tgttttacgt tttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1018

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 2

Met Ala Leu Ser Ser Ser Ala Leu Arg Thr Val Ser Ser Ser Val Lys

1

5

10

15

Val Val Gly Pro Ala Arg Ser Lys Ser Ala Thr Val Pro Thr Gln Thr

20

25

30

Val Leu Pro Phe Lys Phe Thr Asn Pro Ser Leu Leu Thr Arg Ser Leu

35

40

45

Ser Phe Ser Ser Lys Gly Ser Ser Phe Asp Ser Phe Ser Val Pro Lys

50

55

60

Arg Ser Phe Ser Cys Arg Ser Gln Ala Thr Pro Ser Asp Asp Ala Ser

65

70

75

80

Arg Pro Thr Lys Val Gln Glu Leu Cys Val Tyr Glu Met Asn Glu Arg

85

90

95

Asp Arg Gly Ser Pro Ala Val Leu Arg Leu Ser Gln Lys Pro Val Asn

100

105

110

Ser Leu Gly Asp Leu Val Pro Phe Ser Asn Lys Val Tyr Ser Gly Asp

--- 115 ---

120

125

Leu Gln Lys Arg Ile Gly Val Thr Ala Glu Tyr Ala Ser

130

135

140

<210> 3

<211> 2060

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (81)..(1718)

<400> 3

cgaaattcct ctactaaca taccagatcc agtctagcgt ttcgattttc tgcttcacat 60

ttctgtttct ttgaccagaa atg gca atc gcg gct caa act ccg gac att ctc 113

Met Ala Ile Ala Ala Gln Thr Pro Asp Ile Leu

1 5 10

ggc gaa cgt cag tcc ggc cag gac gtc cgc act caa aat gtg gtg gca 161

Gly Glu Arg Gln Ser Gly Gln Asp Val Arg Thr Gln Asn Val Val Ala

15 20 25

tgt caa gcg gtt gcc aat att gtc aaa tct tca ctt ggt cct gtc gga 209

Cys Gln Ala Val Ala Asn Ile Val Lys Ser Ser Leu Gly Pro Val Gly

30 35 40

ctc gac aag atg cta gtg gat gat att ggt gat gta aca att aca aat 257

Leu Asp Lys Met Leu Val Asp Asp Ile Gly Asp Val Thr Ile Thr Asn

45 50 55

gat ggt gct acg att ctt aag atg tta gaa gta gag cat cct gca gca 305

Asp Gly Ala Thr Ile Leu Lys Met Leu Glu Val Glu His Pro Ala Ala

60 65 70 75

aag gtg ctc gtg gag ttg gct gag ctt caa gac cga gaa gtt gga gat 353

Lys Val Leu Val Glu Leu Ala Glu Leu Gln Asp Arg Glu Val Gly Asp

80 85 90

gga acc act tcg gtt gtc atc ata gca gct gag ttg ctc aag aga gca 401

Gly Thr Thr Ser Val Val Ile Ile Ala Ala Glu Leu Leu Lys Arg Ala

95

100

105

aat gat ctc gtg agg aat aag atc cac cca aca tca ata atc agt gga 449

Asn Asp Leu Val Arg Asn Lys Ile His Pro Thr Ser Ile Ile Ser Gly

110

115

120

tac agg ctt gct atg agg gaa gca tgc aag tat gtt gaa gag aaa ttg 497

Tyr Arg Leu Ala Met Arg Glu Ala Cys Lys Tyr Val Glu Glu Lys Leu

125

130

135

tca atg aag gtt gaa aag ctt gga aaa gat tct cta gta aac tgt gca 545

Ser Met Lys Val Glu Lys Leu Gly Lys Asp Ser Leu Val Asn Cys Ala

140

145

150

155

aag aca agc atg tcc tca aag ttg ata gct ggt gac agc gac ttc ttt 593

Lys Thr Ser Met Ser Ser Lys Leu Ile Ala Gly Asp Ser Asp Phe Phe

160

165

170

gca aat ttg gtt gta gat gct gta caa gca gta aag atg acc aat gca 641

Ala Asn Leu Val Val Asp Ala Val Gln Ala Val Lys Met Thr Asn Ala

175

180

185

cgg ggg gaa atc aaa tat cct atc aag agt ata aat att ttg aaa gct 689

Arg Gly Glu Ile Lys Tyr Pro Ile Lys Ser Ile Asn Ile Leu Lys Ala

190

195

200

cat gga aaa agt gca aga gat agc tgc ctt ttg aat ggc tat gct ctc 737

His Gly Lys Ser Ala Arg Asp Ser Cys Leu Leu Asn Gly Tyr Ala Leu

205

210

215

aat act ggt cgt gct gct caa ggg atg cct atg aga gtt gca cct gca 785

Asn Thr Gly Arg Ala Ala Gln Gly Met Pro Met Arg Val Ala Pro Ala

220

225

230

235

agg att gct tgt ctt gac ttt aat ctt cag aaa acg aag atg caa ttg 833

Arg Ile Ala Cys Leu Asp Phe Asn Leu Gln Lys Thr Lys Met Gln Leu

240

245

250

ggt gta caa gtc tta gtc act gat ccc agg gag ctt gaa aga att cgt 881

Gly Val Gln Val Leu Val Thr Asp Pro Arg Glu Leu Glu Arg Ile Arg

255

260

265

caa aga gaa gct gat atg aca aag gaa cgg att gag aaa ctc ctg aaa 929

Gln Arg Glu Ala Asp Met Thr Lys Glu Arg Ile Glu Lys Leu Leu Lys

270

275

280

gct gga gca aat gtt gtt cta acc aca aag gga att gat gac atg gca 977

Ala Gly Ala Asn Val Val Leu Thr Thr Lys Gly Ile Asp Asp Met Ala

285

290

295

ctt aaa tat ttt gtg gag gct ggg gct att gct gtg aga cgt gtt cgg 1025

Leu Lys Tyr Phe Val Glu Ala Gly Ala Ile Ala Val Arg Arg Val Arg

300

305

310

315

aaa gag gat atg cgc cat gtt gcc aag gca act ggt gca aca ctg gtt 1073

Lys Glu Asp Met Arg His Val Ala Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Val

320

325

330

tca aca ttt gct gac atg gaa gga gag gaa aca ttt gat tca tca ctg 1121

Ser Thr Phe Ala Asp Met Glu Gly Glu Glu Thr Phe Asp Ser Ser Leu

335

340

345

ctt gga caa gct gaa gaa gtt gtg gag gag cgc att gct gat gac gat 1169

Leu Gly Gln Ala Glu Glu Val Val Glu Glu Arg Ile Ala Asp Asp Asp

350

355

360

gtg att atg ata aaa ggg aca aag act aca agt gcg gtt tcc ttg att 1217

Val Ile Met Ile Lys Gly Thr Lys Thr Thr Ser Ala Val Ser Leu Ile

365

370

375

ctt cgt ggt gca aat gac tat atg ctc gat gag atg gag cga gcc ctg 1265

Leu Arg Gly Ala Asn Asp Tyr Met Leu Asp Glu Met Glu Arg Ala Leu

380

385

390

395

cat gat gct tta tgt att gtc aag aga acc ctt gaa tct aat aca gta 1313

His Asp Ala Leu Cys Ile Val Lys Arg Thr Leu Glu Ser Asn Thr Val

400

405

410

gtt gca ggt gga ggt gct gtt gag gct gcc ttg tct gtg cac ttg gag 1361

Val Ala Gly Gly Gly Ala Val Glu Ala Ala Leu Ser Val His Leu Glu

415

420

425

tac ctc gct aca act ctt ggg tca cga gag cag tta gca ata gca gag 1409

Tyr Leu Ala Thr Thr Leu Gly Ser Arg Glu Gln Leu Ala Ile Ala Glu

430

435

440

ttt gca gaa tcc ttg ttg att ata cca aag gtt ctt gct gtc aat gct 1457

Phe Ala Glu Ser Leu Leu Ile Ile Pro Lys Val Leu Ala Val Asn Ala

445

450

455

gcc aaa gat gcc act gaa tta gct gca aaa ctc cgg gct tac cac cat 1505

Ala Lys Asp Ala Thr Glu Leu Ala Ala Lys Leu Arg Ala Tyr His His

460

465

470

475

aca gca caa aca aag gct gat aag aaa cat tta tca agc atg gga cta 1553

Thr Ala Gln Thr Lys Ala Asp Lys Lys His Leu Ser Ser Met Gly Leu

480

485

490

gac ctt tca aag ggg acc atc cga aac aac tta gaa gct gga gtc att 1601

Asp Leu Ser Lys Gly Thr Ile Arg Asn Asn Leu Glu Ala Gly Val Ile

495

500

505

gaa cct gca atg agc aaa ata aag ata att cag ttt gct act gaa gca 1649

Glu Pro Ala Met Ser Lys Ile Lys Ile Ile Gln Phe Ala Thr Glu Ala

510

515

520

gcc ata aca att ctt cga att gat gac atg atc aag ctt gtc aag gat 1697

Ala Ile Thr Ile Leu Arg Ile Asp Asp Met Ile Lys Leu Val Lys Asp

525

530

535

gag act cag aat gaa gag gaa tagatgcaga ctcttgtaag ctgcctccct 1748

Glu Thr Gln Asn Glu Glu Glu

540

545

tttgttttca aatttgtgtc ccttgcgagc tggaggaaag ggggggtgtt tatgtggtgt 1808

tttcagtgggt ttttaattttt caaggagctc gcggcctgtg tacttttaggt tagagtccat 1868

ccaaggggtg tttattggat aatgcctaag ctgtttctcg tctattagta ggctggtagt 1928

tccactgagt tctcatccca attaaaagaa tgagatcaaa gggtcctaaa ttcgtactca 1988

ttgggtgcacg atttgtttct gacaagcata agacttgacc ctctctatca caataaaaaa 2048

aaaaaaaaaa aa

2060

<210> 4

<211> 546

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 4

Met Ala Ile Ala Ala Gln Thr Pro Asp Ile Leu Gly Glu Arg Gln Ser

1

5

10

15

Gly Gln Asp Val Arg Thr Gln Asn Val Val Ala Cys Gln Ala Val Ala

20

25

30

Asn Ile Val Lys Ser Ser Leu Gly Pro Val Gly Leu Asp Lys Met Leu

35

40

45

Val Asp Asp Ile Gly Asp Val Thr Ile Thr Asn Asp Gly Ala Thr Ile

50

55

60

Leu Lys Met Leu Glu Val Glu His Pro Ala Ala Lys Val Leu Val Glu

65

70

75

80

Leu Ala Glu Leu Gln Asp Arg Glu Val Gly Asp Gly Thr Thr Ser Val

85

90

95

Val Ile Ile Ala Ala Glu Leu Leu Lys Arg Ala Asn Asp Leu Val Arg

100

105

110

Asn Lys Ile His Pro Thr Ser Ile Ile Ser Gly Tyr Arg Leu Ala Met

115

120

125

Arg Glu Ala Cys Lys Tyr Val Glu Glu Lys Leu Ser Met Lys Val Glu

130

135

140

Lys Leu Gly Lys Asp Ser Leu Val Asn Cys Ala Lys Thr Ser Met Ser

145

150

155

160

Ser Lys Leu Ile Ala Gly Asp Ser Asp Phe Phe Ala Asn Leu Val Val

165

170

175

Asp Ala Val Gln Ala Val Lys Met Thr Asn Ala Arg Gly Glu Ile Lys

180

185

190

Tyr Pro Ile Lys Ser Ile Asn Ile Leu Lys Ala His Gly Lys Ser Ala

195

200

205

Arg Asp Ser Cys Leu Leu Asn Gly Tyr Ala Leu Asn Thr Gly Arg Ala
 210 215 220

Ala Gln Gly Met Pro Met Arg Val Ala Pro Ala Arg Ile Ala Cys Leu
 225 230 235 240

Asp Phe Asn Leu Gln Lys Thr Lys Met Gln Leu Gly Val Gln Val Leu
 245 250 255

Val Thr Asp Pro Arg Glu Leu Glu Arg Ile Arg Gln Arg Glu Ala Asp
 260 265 270

Met Thr Lys Glu Arg Ile Glu Lys Leu Leu Lys Ala Gly Ala Asn Val
 275 280 285

Val Leu Thr Thr Lys Gly Ile Asp Asp Met Ala Leu Lys Tyr Phe Val
 290 295 300

Glu Ala Gly Ala Ile Ala Val Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Met Arg
 305 310 315 320

His Val Ala Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Val Ser Thr Phe Ala Asp
 325 330 335

Met Glu Gly Glu Glu Thr Phe Asp Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ala Glu
 340 345 350

Glu Val Val Glu Glu Arg Ile Ala Asp Asp Asp Val Ile Met Ile Lys
 355 360 365

Gly Thr Lys Thr Thr Ser Ala Val Ser Leu Ile Leu Arg Gly Ala Asn
370 375 380

Asp Tyr Met Leu Asp Glu Met Glu Arg Ala Leu His Asp Ala Leu Cys
385 390 395 400

Ile Val Lys Arg Thr Leu Glu Ser Asn Thr Val Val Ala Gly Gly Gly
405 410 415

Ala Val Glu Ala Ala Leu Ser Val His Leu Glu Tyr Leu Ala Thr Thr
420 425 430

Leu Gly Ser Arg Glu Gln Leu Ala Ile Ala Glu Phe Ala Glu Ser Leu
435 440 445

Leu Ile Ile Pro Lys Val Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Asp Ala Thr
450 455 460

Glu Leu Ala Ala Lys Leu Arg Ala Tyr His His Thr Ala Gln Thr Lys
465 470 475 480

Ala Asp Lys Lys His Leu Ser Ser Met Gly Leu Asp Leu Ser Lys Gly
485 490 495

Thr Ile Arg Asn Asn Leu Glu Ala Gly Val Ile Glu Pro Ala Met Ser
500 505 510

Lys Ile Lys Ile Ile Gln Phe Ala Thr Glu Ala Ala Ile Thr Ile Leu

515

520

525

Arg Ile Asp Asp Met Ile Lys Leu Val Lys Asp Glu Thr Gln Asn Glu

530

535

540

Glu Glu

545

<210> 5

<211> 588

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(262)

<400> 5

gaaaaacaaa gcaatctcct gaagg atg tct tgc tgt ggt gga aac tgt ggc 52

Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly

1

5

tgc gga gca agc tgc aat tgc ggc aac ggc tgt gga ggg tgc aag atg 100

Cys Gly Ala Ser Cys Asn Cys Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met

10

15

20

25

tac cca gac atg ggc ttc gcc gag aag acc act acc gag act ctg gtt 148

Tyr Pro Asp Met Gly Phe Ala Glu Lys Thr Thr Thr Glu Thr Leu Val

30

35

40

ctc ggc gtg ggg cct gag agg gcc cac ttt gag gga gcc gag atg ggc 196

Leu Gly Val Gly Pro Glu Arg Ala His Phe Glu Gly Ala Glu Met Gly

45

50

55

gtg ccg gcc gag aac gga ggc tgc aag tgc gga agt aac tgc acc tgc 244

Val Pro Ala Glu Asn Gly Gly Cys Lys Cys Gly Ser Asn Cys Thr Cys

60

65

70

gac ccc tgc act tgt aaa tgaggggaaa gtgacaggga aggtccgatc 292

Asp Pro Cys Thr Cys Lys

75

tattattagt ctatatgtgt gtgttgggag tcttgcttac aataaaccag tcatgccttg 352

cgtttcctcc atgcgcagat cttaggtttt aggatatctc tgtggtttct ccaagctatg 412

gattttcagt gtctagtttt cctgtattac aaggatagtt tataaccgta tatgcatggt 472

cggaatcctt ccaaccattt cgtttgtcta aatatatata tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt 532

tgatgggaaa gtgagcttct ttatgtttta tgactaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 588

<210> 6

<211> 79

<212> PRT

<213> *Bruguiera sexangula*

<400> 6

Met Ser Cys Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys Gly Ala Ser Cys Asn Cys

1 5 10 15

Gly Asn Gly Cys Gly Gly Cys Lys Met Tyr Pro Asp Met Gly Phe Ala

20 25 30

Glu Lys Thr Thr Thr Glu Thr Leu Val Leu Gly Val Gly Pro Glu Arg

35 40 45

Ala His Phe Glu Gly Ala Glu Met Gly Val Pro Ala Glu Asn Gly Gly

50 55 60

Cys Lys Cys Gly Ser Asn Cys Thr Cys Asp Pro Cys Thr Cys Lys

65 70 75

<210> 7

<211> 1280

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1002)

<400> 7

att gaa ggg gaa gtg gtg gaa gtc caa att gat cgg ccg gcg gtg acc 48
Ile Glu Gly Glu Val Val Glu Val Gln Ile Asp Arg Pro Ala Val Thr
1 5 10 15

ggc gcc gcg tcc aag acg ggg aaa ttg acg cta aag acg acg gag atg 96
Gly Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Thr Thr Glu Met
20 25 30

gag acg gtg tac gat ttg ggg gcg aaa atg ata gag gca ttg ggg aag 144
Glu Thr Val Tyr Asp Leu Gly Ala Lys Met Ile Glu Ala Leu Gly Lys
35 40 45

gaa aag gtg cag agt ggg gat gtt att gca att gac aag gcg tcc ggc 192
Glu Lys Val Gln Ser Gly Asp Val Ile Ala Ile Asp Lys Ala Ser Gly
50 55 60

aaa att aca aag ctt ggg cgt tca ttt tcg cgg tct agg gat tac gat 240
Lys Ile Thr Lys Leu Gly Arg Ser Phe Ser Arg Ser Arg Asp Tyr Asp
65 70 75 80

gcc atg gga cca cag gtg aag ttt gtt cag tgc cct gat ggg gag ctg 288
Ala Met Gly Pro Gln Val Lys Phe Val Gln Cys Pro Asp Gly Glu Leu
85 90 95

cag aag agg aaa gag gtc gtg cat tgt gtc tca ctg cac gag att gat 336
Gln Lys Arg Lys Glu Val Val His Cys Val Ser Leu His Glu Ile Asp
100 105 110

gtt atc aat agc aga aca cag ggg ttt ctt gct ctt ttc acc ggg gat 384

Val Ile Asn Ser Arg Thr Gln Gly Phe Leu Ala Leu Phe Thr Gly Asp

115

120

125

act ggt gaa atc cgt gcg gag gtg agg gaa caa att gac aca aag gtg 432

Thr Gly Glu Ile Arg Ala Glu Val Arg Glu Gln Ile Asp Thr Lys Val

130

135

140

gct gaa tgg aga gag gaa ggg aaa gca gag att gtg cca ggt gtc ctc 480

Ala Glu Trp Arg Glu Glu Gly Lys Ala Glu Ile Val Pro Gly Val Leu

145

150

155

160

ttt att gat gag gtc cac atg ctt gac att gag tgc ttc tca ttt ctg 528

Phe Ile Asp Glu Val His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Ser Phe Leu

165

170

175

aat cgt gct ctt gag aat gag atg gcg cca ata tta gtt gtt gct acc 576

Asn Arg Ala Leu Glu Asn Glu Met Ala Pro Ile Leu Val Val Ala Thr

180

185

190

aac aga ggg atc acc aca atc aga ggc aca aat tac aaa tct cct cat 624

Asn Arg Gly Ile Thr Thr Ile Arg Gly Thr Asn Tyr Lys Ser Pro His

195

200

205

ggg att cca ata gat ctc ctt gat cga cta ctc att atc aca act caa 672

Gly Ile Pro Ile Asp Leu Leu Asp Arg Leu Leu Ile Ile Thr Thr Gln

210

215

220

cct tac aca aag gat gaa att cgt aag att ctg gat atc aga tgt cag 720

Pro Tyr Thr Lys Asp Glu Ile Arg Lys Ile Leu Asp Ile Arg Cys Gln
225 230 235 240

gaa gaa gat gtg gag atg gct gaa gag gca aag gct ttg tta aca cat 768
Glu Glu Asp Val Glu Met Ala Glu Glu Ala Lys Ala Leu Leu Thr His
245 250 255

att ggg gca gaa aca tcc ttg aga tat gcc atc cat ctc att act gct 816
Ile Gly Ala Glu Thr Ser Leu Arg Tyr Ala Ile His Leu Ile Thr Ala
260 265 270

gca gca ttg gca tgc cag aag cga aag gga aag ctt gtg gaa act gag 864
Ala Ala Leu Ala Cys Gln Lys Arg Lys Gly Lys Leu Val Glu Thr Glu
275 280 285

gac att agt cga gct tac aat ctg ttt ctt gat gta aag aga tct aca 912
Asp Ile Ser Arg Ala Tyr Asn Leu Phe Leu Asp Val Lys Arg Ser Thr
290 295 300

cag tac cta ata gag tat cag aat cag tac atg ttt aat gag gca ccg 960
Gln Tyr Leu Ile Glu Tyr Gln Asn Gln Tyr Met Phe Asn Glu Ala Pro
305 310 315 320

gta gga gaa ggg gac gaa gaa ggg gcc aat gcc atg ctt tct 1002
Val Gly Glu Gly Asp Glu Glu Gly Ala Asn Ala Met Leu Ser
325 330

tgaaggcca taagctatgg agtctttgtg aaacccttct ccctacttta ttcgcagcac 1062

gagccctgaa atgaagaaca atggtagact tggatccac ctggccctt atgtatgtct 1122

tctggaattg aaaaaagagt ccaagaaatt tgaatttcat gaaattggag aactgaactg 1182

tgcttactaa attgctactt tgcaagtaat gatagggcac tcacgcttga ctggctaagt 1242

atttatgttt ttatcatcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1280

<210> 8

<211> 334

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 8

Ile Glu Gly Glu Val Val Glu Val Gln Ile Asp Arg Pro Ala Val Thr

1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Lys Thr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Thr Thr Glu Met

20 25 30

Glu Thr Val Tyr Asp Leu Gly Ala Lys Met Ile Glu Ala Leu Gly Lys

35 40 45

Glu Lys Val Gln Ser Gly Asp Val Ile Ala Ile Asp Lys Ala Ser Gly

50 55 60

Lys Ile Thr Lys Leu Gly Arg Ser Phe Ser Arg Ser Arg Asp Tyr Asp

65 70 75 80

Ala Met Gly Pro Gln Val Lys Phe Val Gln Cys Pro Asp Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Lys Arg Lys Glu Val Val His Cys Val Ser Leu His Glu Ile Asp
100 105 110

Val Ile Asn Ser Arg Thr Gln Gly Phe Leu Ala Leu Phe Thr Gly Asp
115 120 125

Thr Gly Glu Ile Arg Ala Glu Val Arg Glu Gln Ile Asp Thr Lys Val
130 135 140

Ala Glu Trp Arg Glu Glu Gly Lys Ala Glu Ile Val Pro Gly Val Leu
145 150 155 160

Phe Ile Asp Glu Val His Met Leu Asp Ile Glu Cys Phe Ser Phe Leu
165 170 175

Asn Arg Ala Leu Glu Asn Glu Met Ala Pro Ile Leu Val Val Ala Thr
180 185 190

Asn Arg Gly Ile Thr Thr Ile Arg Gly Thr Asn Tyr Lys Ser Pro His
195 200 205

Gly Ile Pro Ile Asp Leu Leu Asp Arg Leu Leu Ile Ile Thr Thr Gln
210 215 220

Pro Tyr Thr Lys Asp Glu Ile Arg Lys Ile Leu Asp Ile Arg Cys Gln

Glu Glu Asp Val Glu Met Ala Glu Glu Ala Lys Ala Leu Leu Thr His

Ile Gly Ala Glu Thr Ser Leu Arg Tyr Ala Ile His Leu Ile Thr Ala

Ala Ala Leu Ala Cys Gln Lys Arg Lys Gly Lys Leu Val Glu Thr Glu

Asp Ile Ser Arg Ala Tyr Asn Leu Phe Leu Asp Val Lys Arg Ser Thr

Gln Tyr Leu Ile Glu Tyr Gln Asn Gln Tyr Met Phe Asn Glu Ala Pro

Val Gly Glu Gly Asp Glu Glu Gly Ala Asn Ala Met Leu Ser

<210> 9

<211> 420

<212> DNA

<213> Bruguiera sexangula

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(194)

<400> 9

cgaaagtata aagtgatcgg cgagcg atg ggt cac tct aac gtc tgg aac tct 53

Met Gly His Ser Asn Val Trp Asn Ser

1

5

cac ccc aag aac tac ggc cct ggt tcc cgc gcc tgt cgg gtg tgt ggg 101

His Pro Lys Asn Tyr Gly Pro Gly Ser Arg Ala Cys Arg Val Cys Gly

10

15

20

25

aat ccg cac ggg ttg atc agg aag tac gga ctc atg tgc tgc aga cag 149

Asn Pro His Gly Leu Ile Arg Lys Tyr Gly Leu Met Cys Cys Arg Gln

30

35

40

tgc ttc cgt agc aat gcc aag gaa att ggc ttc att aag tac cgc 194

Cys Phe Arg Ser Asn Ala Lys Glu Ile Gly Phe Ile Lys Tyr Arg

45

50

55

tgaatgatat cgatatggcc cagaatggcc tgtggcgggtg cgtgttcgat ttcagtagtt 254

ccccctcttc ggatgagctt taggacaatg ttctcttttag tttatgtatt gttgaacttg 314

gactgatgtt gaactaacga tattctggaa tcatttgata tttcgagagt ttattatttt 374

gatcatcatc ctcttgcttc tctgcttaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

420

<210> 10

<211> 56

<212> PRT

<213> *Bruguiera sexangula*

<400> 10

Met Gly His Ser Asn Val Trp Asn Ser His Pro Lys Asn Tyr Gly Pro

1

5

10

15

Gly Ser Arg Ala Cys Arg Val Cys Gly Asn Pro His Gly Leu Ile Arg

20

25

30

Lys Tyr Gly Leu Met Cys Cys Arg Gln Cys Phe Arg Ser Asn Ala Lys

35

40

45

Glu Ile Gly Phe Ile Lys Tyr Arg

50

55

<210> 11

<211> 1664

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (34)..(1380)

<400> 11

tctctcttta caggttaaag ctaagacttt ata atg ggt aag gag aag att cac 54

Met Gly Lys Glu Lys Ile His

1

5

att aac att gtg gtt att ggc cat gtc gac tcc gga aag tca acc aca 102

Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr

10

15

20

act ggc cac ttg att tac aag ctt gga ggt atc gac aag cgt gtg att 150

Thr Gly His Leu Ile Tyr Lys Leu Gly Gly Ile Asp Lys Arg Val Ile

25

30

35

gag agg ttt gag aag gaa gct gct gag atg aac aag agg tca ttc aag 198

Glu Arg Phe Glu Lys Glu Ala Ala Glu Met Asn Lys Arg Ser Phe Lys

40

45

50

55

tat gcc tgg gtg ctt gac aag ctg aag gct gag cgt gag cgt ggt atc 246

Tyr Ala Trp Val Leu Asp Lys Leu Lys Ala Glu Arg Glu Arg Gly Ile

60

65

70

acc att gat att gcc ttg tgg aag ttc gag aca acc aaa tat tac tgc 294

Thr Ile Asp Ile Ala Leu Trp Lys Phe Glu Thr Thr Lys Tyr Tyr Cys

75

80

85

acg gtc att gat gct cct gga cat cgt gac ttt att aag aat atg atc 342

Thr Val Ile Asp Ala Pro Gly His Arg Asp Phe Ile Lys Asn Met Ile

90

95

100

acc ggg act tcc caa gct gac tgt gct gtc ctc atc att gac tct acc 390

Thr Gly Thr Ser Gln Ala Asp Cys Ala Val Leu Ile Ile Asp Ser Thr
105 110 115

act ggt ggc ttt gag gct ggt atc tct aaa gat ggt cag acc cgc gag 438
Thr Gly Gly Phe Glu Ala Gly Ile Ser Lys Asp Gly Gln Thr Arg Glu
120 125 130 135

cat gcc ctg ctt gcc ttc acc ctt ggt gtt aag caa atg att tgc tgc 486
His Ala Leu Leu Ala Phe Thr Leu Gly Val Lys Gln Met Ile Cys Cys
140 145 150

tgc aac aag atg gat gct acc act tcc aag tat tct aag gca aga tat 534
Cys Asn Lys Met Asp Ala Thr Thr Ser Lys Tyr Ser Lys Ala Arg Tyr
155 160 165

gat gaa att gtt aag gaa gtg tca tcc tac ttg aag aag gtt ggt tac 582
Asp Glu Ile Val Lys Glu Val Ser Ser Tyr Leu Lys Lys Val Gly Tyr
170 175 180

aac cca gag aag att cct ttt gtc ccc ata tct gga ttt gag ggt gac 630
Asn Pro Glu Lys Ile Pro Phe Val Pro Ile Ser Gly Phe Glu Gly Asp
185 190 195

aac atg att gag aga tcc acc aac ctt gac tgg tac aag ggc cca act 678
Asn Met Ile Glu Arg Ser Thr Asn Leu Asp Trp Tyr Lys Gly Pro Thr
200 205 210 215

ctt ctt gag gcc ctg gac atg atc cag gag cca aag agg cca tca gat 726
Leu Leu Glu Ala Leu Asp Met Ile Gln Glu Pro Lys Arg Pro Ser Asp

220

225

230

aag ccc ctc cgt ctc cca ctt cag gat gtg tac aag att ggt ggt att 774

Lys Pro Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile Gly Gly Ile

235

240

245

ggg aca gtc cca gtg ggt cgt gtt gaa act ggt gtc ctg aag cct gga 822

Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Val Leu Lys Pro Gly

250

255

260

atg gtt gtt act ttt ggt ccc tca gga ctg acc act gaa gtt aag tct 870

Met Val Val Thr Phe Gly Pro Ser Gly Leu Thr Thr Glu Val Lys Ser

265

270

275

gtg gag atg cac cat gaa gct ctc caa gag gct ctt ccc gga gac aac 918

Val Glu Met His His Glu Ala Leu Gln Glu Ala Leu Pro Gly Asp Asn

280

285

290

295

gtt ggc ttc aat gtt aag aat gtt tcc gtg aag gat ctt aag cgg ggt 966

Val Gly Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Leu Lys Arg Gly

300

305

310

tat gtt gcc tca aac tcc aag gat gat cct gcc aag gag gca tct agc 1014

Tyr Val Ala Ser Asn Ser Lys Asp Asp Pro Ala Lys Glu Ala Ser Ser

315

320

325

ttc acc tcc caa gtt atc atc atg aac cac cct ggt cag att gga aat 1062

Phe Thr Ser Gln Val Ile Ile Met Asn His Pro Gly Gln Ile Gly Asn

330

335

340

ggt tat gcc cct gtt ctg gat tgc cac acc tct cac att gct gtc aag 1110

Gly Tyr Ala Pro Val Leu Asp Cys His Thr Ser His Ile Ala Val Lys

345

350

355

ttt tct gag atc ctc aca aag att gat agg cga tct ggc aag gag ctt 1158

Phe Ser Glu Ile Leu Thr Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly Lys Glu Leu

360

365

370

375

gaa aag gag ccc aag ttc ttg aag aat ggt gat gct ggg ttc gtg aag 1206

Glu Lys Glu Pro Lys Phe Leu Lys Asn Gly Asp Ala Gly Phe Val Lys

380

385

390

atg att ccg acc aag cct atg gtg gtg gaa act ttc tcc gag tat cct 1254

Met Ile Pro Thr Lys Pro Met Val Val Glu Thr Phe Ser Glu Tyr Pro

395

400

405

ccg ctt ggt aga ttt gcc gtc agg gac atg cgc cag act gtt gca gtg 1302

Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr Val Ala Val

410

415

420

gga gtc atc aag agt gtc gag aaa aag gaa cct tct gga gct aag gtg 1350

Gly Val Ile Lys Ser Val Glu Lys Lys Glu Pro Ser Gly Ala Lys Val

425

430

435

act aaa tct gct gcc aag aag ggt ggc aaa tgaaccgtgc aagtcagagt 1400

Thr Lys Ser Ala Ala Lys Lys Gly Gly Lys

440

445

tgatgtagat gaaggctatt ggaagaataa agactgggcc ctggttagcg gtctaattat 1460

tggatgttca gcagttggtt tcgagaacta cagtttcaat tcagcgccat catcacggag 1520

ctgttggtcc cagaattggg ttcttgaccg tcggtggcat tggctgttg tttgagtgac 1580

ttctttgtgt catgittaga ctttatcgga ttgctatit cataaagcgg cttgggaatt 1640

ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1664

<210> 12

<211> 449

<212> PRT

<213> Bruguiera sexangula

<400> 12

Met Gly Lys Glu Lys Ile His Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val

1

5

10

15

Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Thr Gly His Leu Ile Tyr Lys Leu Gly

20

25

30

Gly Ile Asp Lys Arg Val Ile Glu Arg Phe Glu Lys Glu Ala Ala Glu

35

40

45

Met Asn Lys Arg Ser Phe Lys Tyr Ala Trp Val Leu Asp Lys Leu Lys

50

55

60

Ala Glu Arg Glu Arg Gly Ile Thr Ile Asp Ile Ala Leu Trp Lys Phe
65 70 75 80

Glu Thr Thr Lys Tyr Tyr Cys Thr Val Ile Asp Ala Pro Gly His Arg
85 90 95

Asp Phe Ile Lys Asn Met Ile Thr Gly Thr Ser Gln Ala Asp Cys Ala
100 105 110

Val Leu Ile Ile Asp Ser Thr Thr Gly Gly Phe Glu Ala Gly Ile Ser
115 120 125

Lys Asp Gly Gln Thr Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Phe Thr Leu Gly
130 135 140

Val Lys Gln Met Ile Cys Cys Cys Asn Lys Met Asp Ala Thr Thr Ser
145 150 155 160

Lys Tyr Ser Lys Ala Arg Tyr Asp Glu Ile Val Lys Glu Val Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Lys Lys Val Gly Tyr Asn Pro Glu Lys Ile Pro Phe Val Pro
180 185 190

Ile Ser Gly Phe Glu Gly Asp Asn Met Ile Glu Arg Ser Thr Asn Leu
195 200 205

Asp Trp Tyr Lys Gly Pro Thr Leu Leu Glu Ala Leu Asp Met Ile Gln
210 215 220

Glu Pro Lys Arg Pro Ser Asp Lys Pro Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp
225 230 235 240

Val Tyr Lys Ile Gly Gly Ile Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu
245 250 255

Thr Gly Val Leu Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe Gly Pro Ser Gly
260 265 270

Leu Thr Thr Glu Val Lys Ser Val Glu Met His His Glu Ala Leu Gln
275 280 285

Glu Ala Leu Pro Gly Asp Asn Val Gly Phe Asn Val Lys Asn Val Ser
290 295 300

Val Lys Asp Leu Lys Arg Gly Tyr Val Ala Ser Asn Ser Lys Asp Asp
305 310 315 320

Pr Ala Lys Glu Ala Ser Ser Phe Thr Ser Gln Val Ile Ile Met Asn
325 330 335

His Pro Gly Gln Ile Gly Asn Gly Tyr Ala Pro Val Leu Asp Cys His
340 345 350

Thr Ser His Ile Ala Val Lys Phe Ser Glu Ile Leu Thr Lys Ile Asp
355 360 365

Arg Arg Ser Gly Lys Glu Leu Glu Lys Glu Pr Lys Phe Leu Lys Asn

370

375

380

Gly Asp Ala Gly Phe Val Lys Met Ile Pro Thr Lys Pro Met Val Val

385

390

395

400

Glu Thr Phe Ser Glu Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp

405

410

415

Met Arg Gln Thr Val Ala Val Gly Val Ile Lys Ser Val Glu Lys Lys

420

425

430

Glu Pro Ser Gly Ala Lys Val Thr Lys Ser Ala Ala Lys Lys Gly Gly

435

440

445

Lys

<210> 13

<211> 770

<212> DNA

<213> *Bruguiera sexangula*

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(769)

<400> 13

c gat gat atg gac gag gcc aca ccc acc ttt gtt tgg ggc acc aat atc 49

Asp Asp Met Asp Glu Ala Thr Pro Thr Phe Val Trp Gly Thr Asn Ile

1 5 10 15

agc gtg cag gat gtc aag gcc gct att cag atg ttt ttg aag cac ttc 97

Ser Val Gln Asp Val Lys Ala Ala Ile Gln Met Phe Leu Lys His Phe

20 25 30

agg gat agt aat cag agt caa agg aac gag att ttt gaa gaa ggg aag 145

Arg Asp Ser Asn Gln Ser Gln Arg Asn Glu Ile Phe Glu Glu Gly Lys

35 40 45

tac gtg aaa gcg ata cat aag gtt ctt gaa gtt gaa gga gag tcg ctt 193

Tyr Val Lys Ala Ile His Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Glu Ser Leu

50 55 60

gat gtt gat gct cgt gat gtg ttt gat tat gat tct gat ttg tat gcc 241

Asp Val Asp Ala Arg Asp Val Phe Asp Tyr Asp Ser Asp Leu Tyr Ala

65 70 75 80

aag atg att cgg tac cca ctt gag gtt ttg gcc att ttc gac att gtt 289

Lys Met Ile Arg Tyr Pro Leu Glu Val Leu Ala Ile Phe Asp Ile Val

85 90 95

ttg atg gat att gtg agt ttg atc aac cct ttg ttt gag aaa cat gta 337

Leu Met Asp Ile Val Ser Leu Ile Asn Pro Leu Phe Glu Lys His Val

100 105 110

caa gtc agg att ttc aat ctt aag acc tcg att aca atg aga aat ctc 385

Gln Val Arg Ile Phe Asn Leu Lys Thr Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu

115

120

125

aac cct tct gat atc gaa aag atg gtg tca ttg aag gga atg ata att 433

Asn Pro Ser Asp Ile Glu Lys Met Val Ser Leu Lys Gly Met Ile Ile

130

135

140

cgg tgt agt tcc ata ata ccg gag atc agg gaa gca gta ttt aga tgc 481

Arg Cys Ser Ser Ile Ile Pro Glu Ile Arg Glu Ala Val Phe Arg Cys

145

150

155

160

ctt gtt tgt ggc tac ttc tct gat ccc atc gtt gtg gat aga gga cgg 529

Leu Val Cys Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ile Val Val Asp Arg Gly Arg

165

170

175

ata agt gaa cct aaa gca tgc ttg aaa gag gaa tgt ctt act aag aac 577

Ile Ser Glu Pro Lys Ala Cys Leu Lys Glu Glu Cys Leu Thr Lys Asn

180

185

190

tcc atg aca cta gtt cac aat cgt tgc agg ttt gct gat aag cag att 625

Ser Met Thr Leu Val His Asn Arg Cys Arg Phe Ala Asp Lys Gln Ile

195

200

205

gtg agg ctc cag gag aca cct gac gag atc cct gaa gga gga aca cca 673

Val Arg Leu Gln Glu Thr Pro Asp Glu Ile Pro Glu Gly Gly Thr Pro

210

215

220

cac acg gtg agc tta ttg atg cat gac aag ctg gta gat gct gga aag 721

His Thr Val Ser Leu Leu Met His Asp Lys Leu Val Asp Ala Gly Lys

225 230 235 240

cca ggt gac agg gtt gag gtc act gga att tat agg gct atg agt gtt a 770

Pro Gly Asp Arg Val Glu Val Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Met Ser Val

245 250 255

<210> 14

<211> 256

<212> PRT

<213> *Bruguiera sexangula*

<400> 14

Asp Asp Met Asp Glu Ala Thr Pro Thr Phe Val Trp Gly Thr Asn Ile

1 5 10 15

Ser Val Gln Asp Val Lys Ala Ala Ile Gln Met Phe Leu Lys His Phe

20 25 30

Arg Asp Ser Asn Gln Ser Gln Arg Asn Glu Ile Phe Glu Glu Gly Lys

35 40 45

Tyr Val Lys Ala Ile His Lys Val Leu Glu Val Glu Gly Glu Ser Leu

50 55 60

Asp Val Asp Ala Arg Asp Val Phe Asp Tyr Asp Ser Asp Leu Tyr Ala

65 70 75 80

Lys Met Ile Arg Tyr Pro Leu Glu Val Leu Ala Ile Phe Asp Ile Val

85

90

95

Leu Met Asp Ile Val Ser Leu Ile Asn Pro Leu Phe Glu Lys His Val

100

105

110

Gln Val Arg Ile Phe Asn Leu Lys Thr Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu

115

120

125

Asn Pro Ser Asp Ile Glu Lys Met Val Ser Leu Lys Gly Met Ile Ile

130

135

140

Arg Cys Ser Ser Ile Ile Pro Glu Ile Arg Glu Ala Val Phe Arg Cys

145

150

155

160

Leu Val Cys Gly Tyr Phe Ser Asp Pro Ile Val Val Asp Arg Gly Arg

165

170

175

Ile Ser Glu Pro Lys Ala Cys Leu Lys Glu Glu Cys Leu Thr Lys Asn

180

185

190

Ser Met Thr Leu Val His Asn Arg Cys Arg Phe Ala Asp Lys Gln Ile

195

200

205

Val Arg Leu Gln Glu Thr Pro Asp Glu Ile Pro Glu Gly Gly Thr Pro

210

215

220

His Thr Val Ser Leu Leu Met His Asp Lys Leu Val Asp Ala Gly Lys

225

230

235

240

Pro Gly Asp Arg Val Glu Val Thr Gly Ile Tyr Arg Ala Met Ser Val

245

250

255

【図面の簡単な説明】

【図 1】

m a n g 1 を導入された大腸菌 (S O L R) の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を用いた。2 つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図 2】

m a n g 1 の各種部分配列を導入された大腸菌 (S O L R) の耐塩性を検出した結果を示す。検出は、コロニー形成を指標に行なった。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を用いた。2 つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

「*」はコード領域および非コード領域を含んだ m a n g 1 の c D N A を指す。

【図 3】

m a n g 1 を導入された酵母の高塩条件下における生育を経時的に計測した結果を示す図である。検出は細胞濃度を指標に行なった。対照としてベクターのみ (p Y E S 2) を用いた。2 つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図 4】

m a n g 1 を導入されたタバコ培養細胞の高塩条件下における生育を検出した結果を示す図である。検出は湿重量を指標に行なった。対照としてベクターのみ (G U S) を用いた。3 つの塩 (N a C l) 濃度で検定を行なった。

【図 5】

m a n g 1 を導入されたタバコ植物体の高塩条件 (1 5 0 m M の N a C l) 下における生育を検出した結果を示す図である。A, C は、対照としてベクターのみ (G U S) を導入したタバコ、B, D は、m a n g 1 を導入したタバコを示す。

【図 6】

m a n g 1 を導入された大腸菌 (S O L R) の熱ストレス耐性を検討した結果

を示す。熱ストレス耐性は40℃培養における生育曲線を指標に評価した。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

【図7】

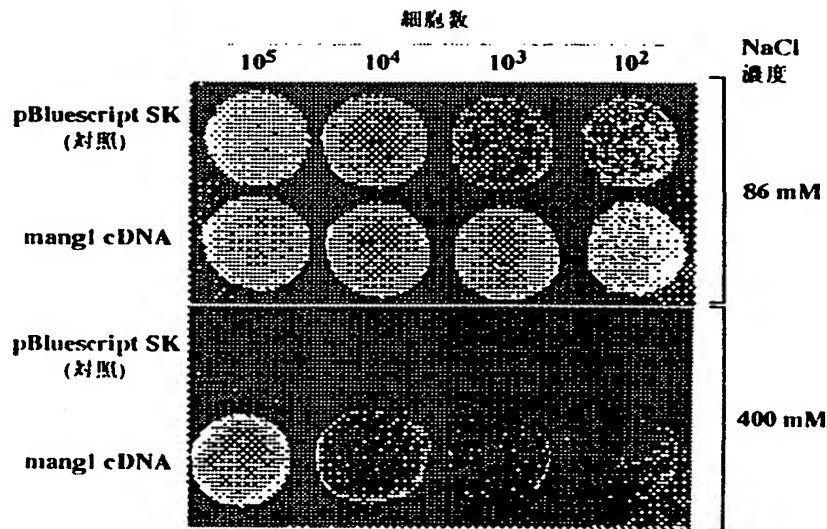
m a n g 1 を導入された大腸菌 (SOLR) の浸透圧耐性を検討した結果を示す。浸透圧耐性は800 mMのソルビトールを含む2YT寒天培地上における生育を指標に評価した。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

【図8】

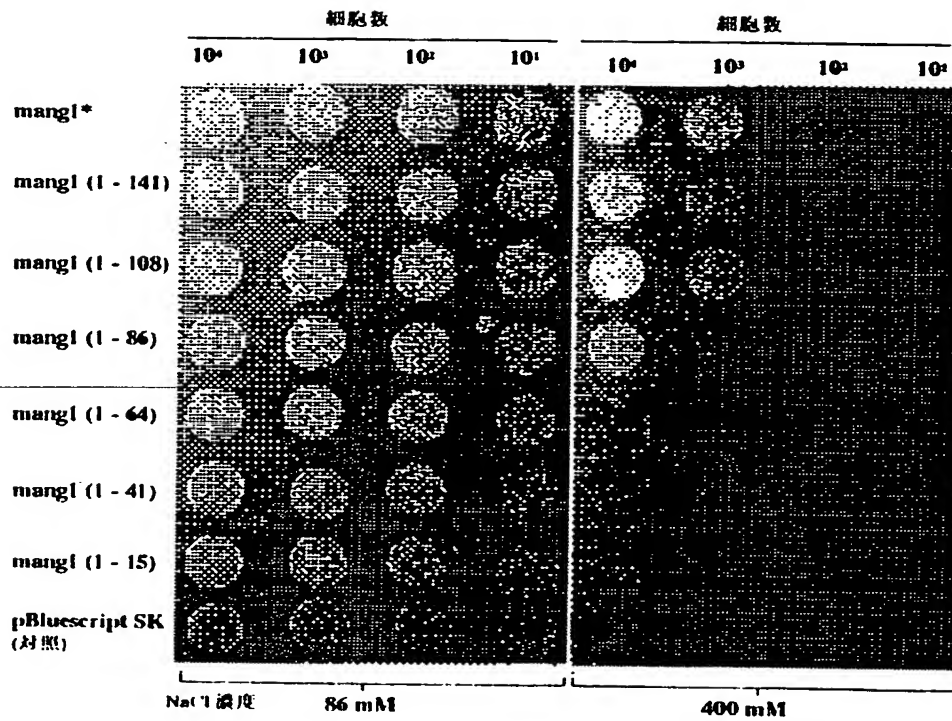
m a n g 1 を導入された大腸菌 (SOLR) の凍結ストレス耐性を検討した結果を示す。凍結ストレス耐性は凍結融解処理を施した菌体の2YT寒天培地上における生育で評価した。対照としてベクターのみ (pBluescript SK) を導入した SOLR を用いた。

【書類名】 図面

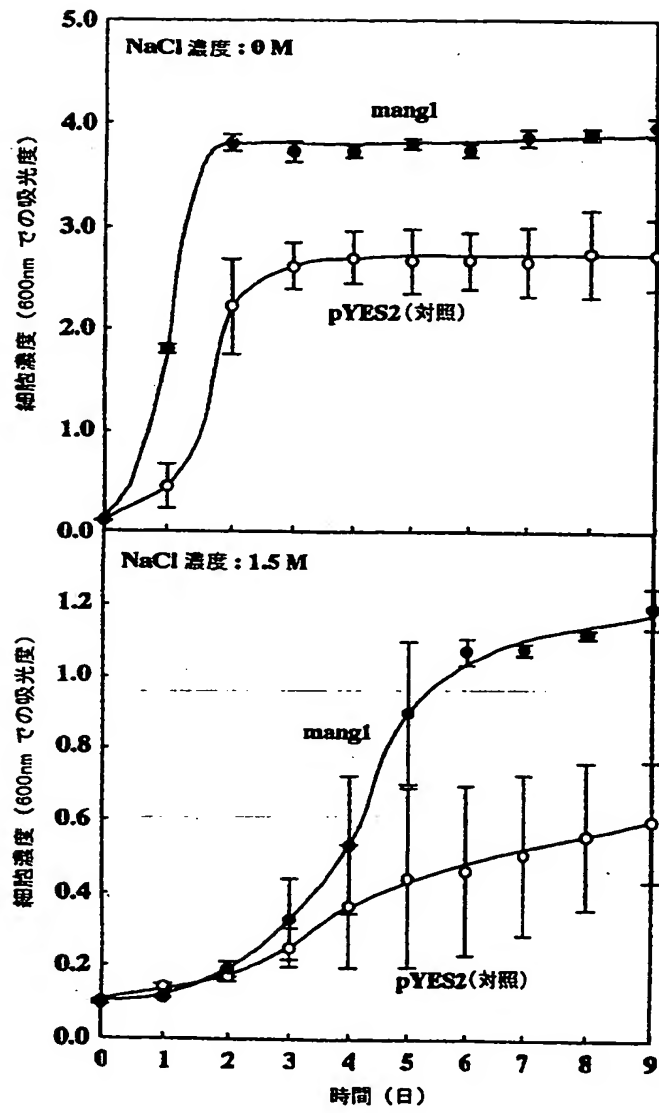
【図 1】



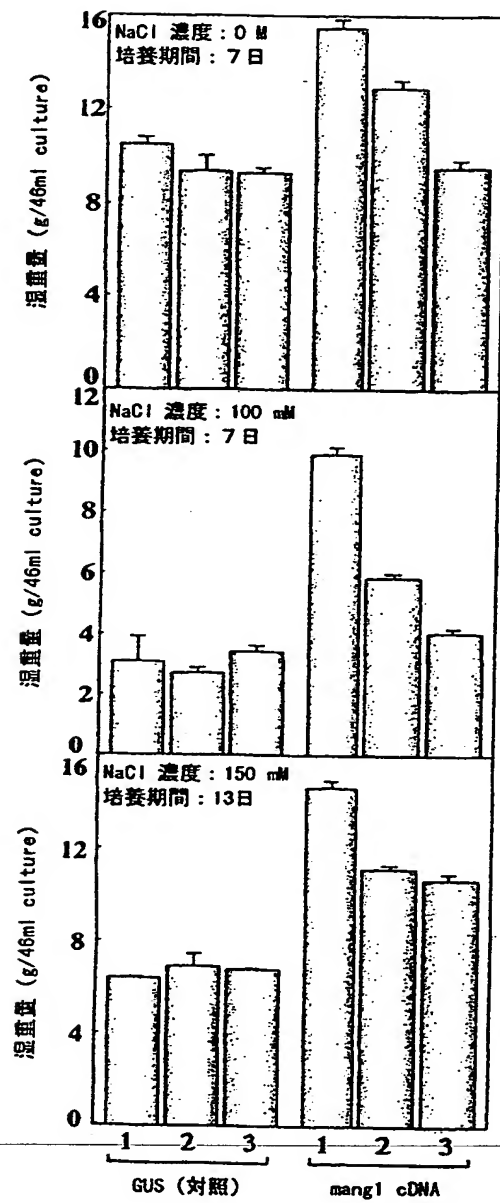
【図 2】



【図3】



【図 4】

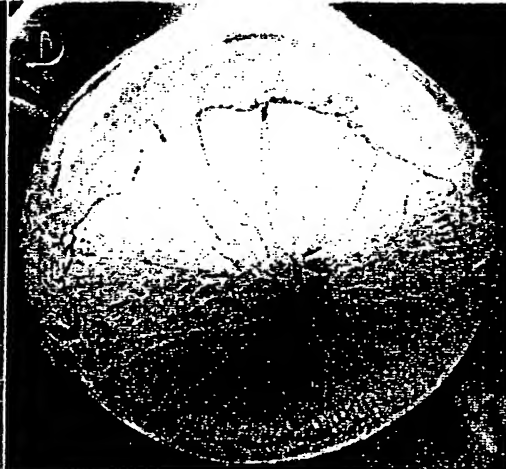
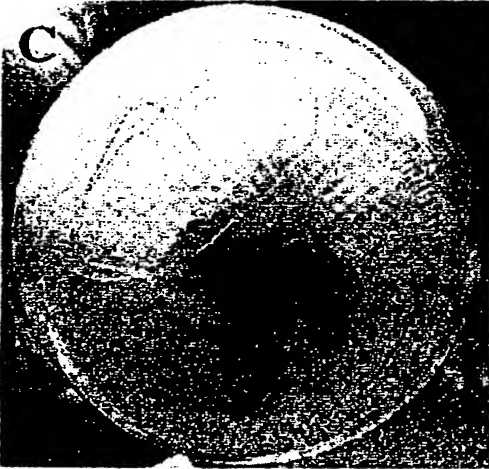


【図5】

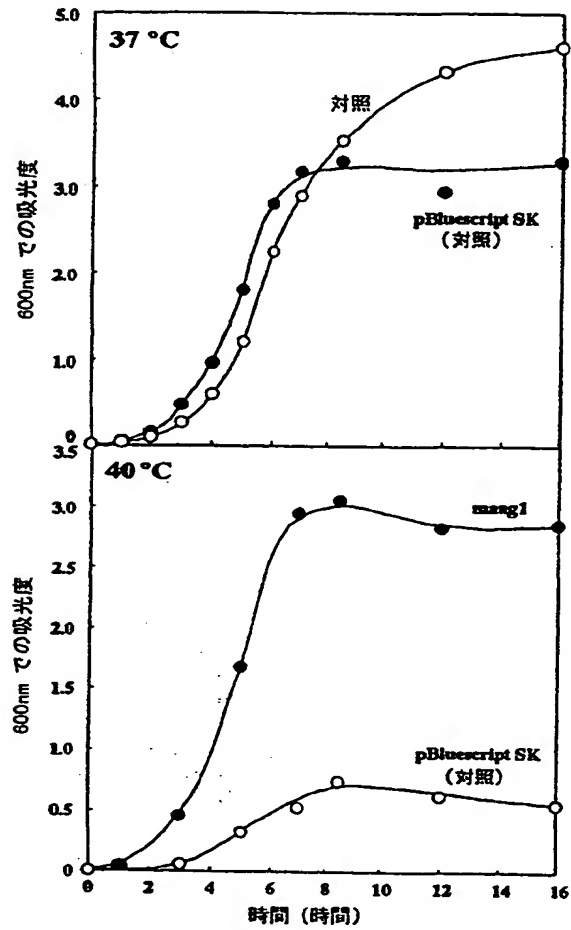
A



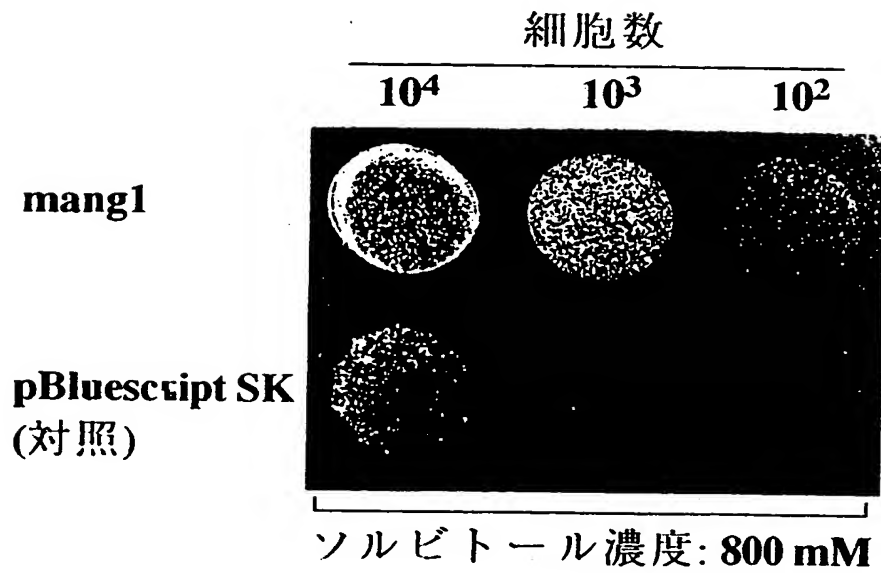
B



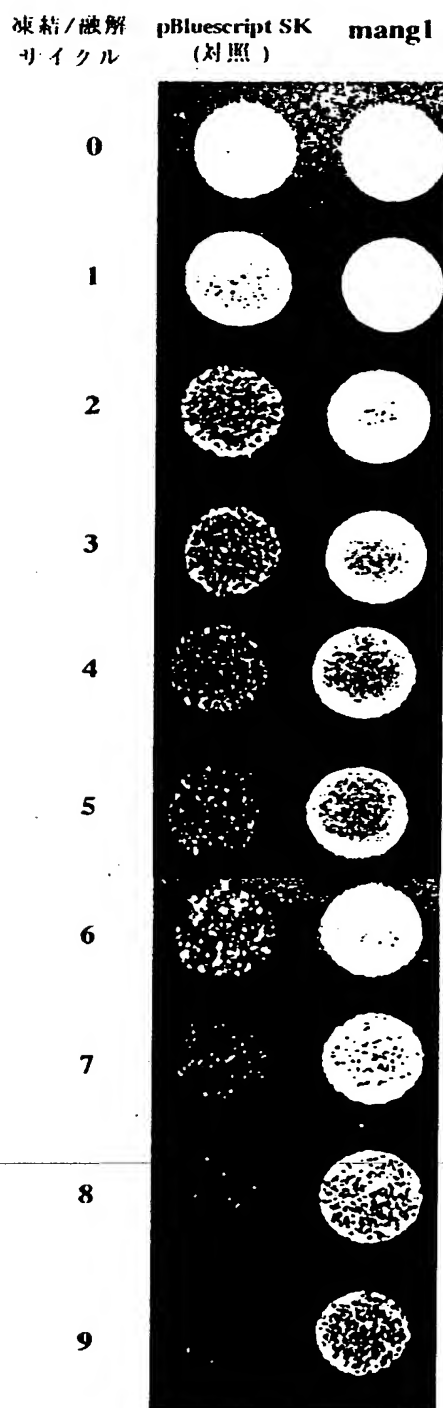
【図6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 各種生物、特に高等植物の環境ストレスに対する耐性を向上させる。

【解決手段】 ストレス感受性の強い大腸菌にマングローブ等のストレス耐性の強い生物由来の cDNA ライブラリーを発現させ、ストレス耐性が強化されたクローンを選抜する。この方法で得た遺伝子を各種細胞で発現させることで、ストレス耐性が強化された形質転換細胞を作出する。

| | |
|-----------|---|
| 【書類名】 | 出願人名義変更届 |
| 【整理番号】 | 11-337 |
| 【あて先】 | 特許庁長官殿 |
| 【事件の表示】 | |
| 【出願番号】 | 特願2000- 85377 |
| 【承継人】 | |
| 【識別番号】 | 396020800 |
| 【氏名又は名称】 | 科学技術振興事業団 |
| 【代表者】 | 川崎 雅弘 |
| 【承継人代理人】 | |
| 【識別番号】 | 100107984 |
| 【弁理士】 | |
| 【氏名又は名称】 | 廣田 雅紀 |
| 【手数料の表示】 | |
| 【予納台帳番号】 | 044347 |
| 【納付金額】 | 4,200円 |
| 【提出物件の目録】 | |
| 【物件名】 | 承継人であることを証する書面 1 |
| 【援用の表示】 | 平成11年特許願第235910号の出願人名義変更届 に添付のものを援用する。 |
| 【物件名】 | 委任状 1 |
| 【援用の表示】 | 平成11年特許願第235910号の出願人名義変更届 に添付のものを援用する。 |
| 【プルーフの要否】 | 要 |

認定・付加情報

| | |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2000-085377 |
| 受付番号 | 50000460779 |
| 書類名 | 出願人名義変更届 |
| 担当官 | 寺内 文男 7068 |
| 作成日 | 平成12年 5月29日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|----------|-------------------------------------|
| 【提出日】 | 平成12年 4月12日 |
| 【承継人】 | |
| 【識別番号】 | 396020800 |
| 【住所又は居所】 | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 【氏名又は名称】 | 科学技術振興事業団 |
| 【承継人代理人】 | 申請人 |
| 【識別番号】 | 100107984 |
| 【住所又は居所】 | 東京都港区赤坂2丁目8番11号 第11赤坂葵ビル502 廣田特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 廣田 雅紀 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599117842]

1. 変更年月日 1999年 7月19日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都八王子市南陽台2-18-12
氏 名 山田 晃世

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 9 1 0 1 7 6 0]

1. 変更年月日 1 9 9 9 年 7 月 2 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都東久留米市大門町 2 - 3 - 6 - 3 0 2

氏 名 小関 良宏

特2000-085377

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

| | |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1998年 2月24日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名 | 科学技術振興事業団 |